



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II**

**DOTTORATO DI RICERCA
IN
BIOLOGIA AVANZATA**

XXIII ciclo

- TESI DI DOTTORATO -

**Un biosensore a fluorescenza
per un rapido *screening* ed il *follow-up*
di pazienti celiaci**



Relatore

Ch.^{mo} Prof. Silvana FILOSA

Correlatore

Dott. Sabato D'AURIA

Coordinatore

Ch.^{mo} Prof. Luciano GAUDIO

Candidata

Dott.^{ssa} Elisa APICELLA

ANNO ACCADEMICO 2009 - 2010

INDICE

Capitolo I: LA MALATTIA CELIACA

1.1 Storia clinica	pag. 1
1.2 Epidemiologia	pag. 3
1.3 Eziologia	pag. 5
1.3.1 Fattori ambientali: il glutine	pag. 7
1.3.2 Fattori genetici	pag. 10
1.4 Patogenesi	pag. 15
1.4.1 Pre-processamento luminale e trasporto transepiteliale dell'antigene glutine	pag. 16
1.4.2 Modificazioni post-traslazionali e legame al complesso HLA	pag. 20
1.4.2.1 Il ruolo della transglutaminasi nella malattia celiaca: la deamidazione dei peptidi del glutine	pag. 20
1.4.2.2 Gli epitopi del glutine ristretti alle regioni DQ2/DQ8	pag. 23
1.4.3 Meccanismo d'immunità adattativa al glutine	pag. 27
1.4.4 Meccanismo d'immunità innata al glutine	pag. 27
1.4.5 Il ruolo dei linfociti intraepiteliali	pag. 28
1.4.6 Cellule T regolatorie	pag. 30
1.4.7 Citochine e rimodellamento della matrice nella malattia celiaca	pag. 31
1.5 Patologia	pag. 34
1.5.1 Tipi di lesioni della mucosa	pag. 36
1.6 Presentazione clinica: segni e sintomi	pag. 37
1.6.1 Categorie di sprue celiaca	pag. 38
1.7 Diagnosi	pag. 41
1.7.1 La biopsia intestinale	pag. 41
1.7.2 Marcatori sierologici	pag. 42
1.8 Trattamento e "follow-up"	pag. 48
1.8.1 La dieta priva di glutine	pag. 48
1.8.2 Il "follow-up"	pag. 49
1.9 Le nuove terapie	pag. 50

Capitolo II: LO SCOPO DEL LAVORO

2.1 I biosensori	pag. 53
2.2 Obiettivi del Progetto di Ricerca	pag. 54

Capitolo III: MATERIALI E METODI

3.1 Materiali	pag. 57
3.1.1 Ceppi batterici	pag. 57
3.1.2 Vettori plasmidici ed enzimi	pag. 57
3.1.3 Reagenti	pag. 57
3.2 Metodi	pag. 58
3.2.1 Produzione della transglutaminasi tissutale ricombinante in <i>Escherichia coli</i>	pag. 58
3.2.1.1 Progettazione dei “primer”	pag. 58
3.2.1.2 Amplificazione per PCR (Polymerase Chain Reaction)	pag. 59
3.2.1.3 Clonaggio nel vettore plasmidico pGEM-T Easy	pag. 60
3.2.1.4 Trasformazione delle cellule competenti	pag. 60
3.2.1.5 Clonaggio nel vettore d’espressione pET-28(a)	pag. 61
3.2.1.6 La sovraespressione della gptTG ricombinante	pag. 62
3.2.1.7 Analisi delle proteine nel lisato batterico	pag. 63
3.3 Elettroforesi: gel di poliacrilammide in condizioni riducenti e denaturanti	pag. 63
3.4 Determinazione della concentrazione proteica	pag. 64
3.5 Saggio enzimatico per la transglutaminasi (EC 2.3.2.13)	pag. 64
3.6 Produzione e purificazione di anticorpi policlonali anti-gptTG	pag. 66
3.7 Marcatura chimica della gptTG e degli Ab anti-gptTG con sonde fluorescenti	pag. 67
3.8 Strumentazione	pag. 67
3.9 Studi di Spettroscopia di fluorescenza	pag. 68
3.9.1 Misure di fluorescenza statica e applicazione del fenomeno “FRET”	pag. 69
3.9.2 Misure di fluorescenza risolta nel tempo	pag. 70
3.10 Configurazione “front-face”	pag. 71
3.10.1 Immobilizzazione di gptTG e Ab anti-gptTG su vetrino	pag. 71

3.11 Determinazione di Singola Molecola basata sul principio della microscopia a fluorescenza	pag. 73
3.11.1 Spettroscopia di Correlazione di Fluorescenza	pag. 73
3.11.2 “FRET” a livello di singola molecola	pag. 76
3.11.3 Aumento di fluorescenza in presenza di particelle metalliche	pag. 80
3.11.3.1 Crescita elettrochimica di nanostrutture d’argento ramificate	pag. 81
3.11.4 Misure di Microscopia Confocale	pag. 82
3.11.4.1 Microscopia a Immagini basata sulla Fluorescenza risolta nel tempo	pag. 83
 Capitolo IV: RISULTATI E DISCUSSIONE	
4.1 Produzione della gptTG ricombinante in <i>Escherichia coli</i>	pag. 84
4.1.1 Clonaggio del cDNA della gptTG nel vettore plasmidico pGEM-T Easy	pag. 85
4.1.2 Analisi di sequenza	pag. 87
4.1.3 Clonaggio del cDNA della gptTG nel vettore d’espressione pET-28(a)	pag. 88
4.1.4 Espressione della gptTG ricombinante in <i>Escherichia coli</i>	pag. 89
4.1.5 Determinazione dell’attività specifica della gptTG ricombinante	pag. 94
4.2 Valutazione funzionale del biosensore: indagini di fluorescenza	pag. 96
4.2.1 Selezione d’immunoreagenti e marcatura con sonde fluorescenti	pag. 96
4.2.2 Saggio di “FRET”: misure di fluorescenza in stadio stazionario	pag. 98
4.2.3 Saggio di “FRET”: misure di fluorescenza risolta nel tempo	pag. 101
4.2.4 Saggio di “FRET”: misure di fluorescenza in configurazione “front-face”	pag. 104
4.2.5 Determinazione di fluorescenza a livello di singola molecola	pag. 108
4.2.5.1 Studi di Spettroscopia di Correlazione di Fluorescenza	pag. 108
4.2.5.2 (Pulse-Interleaved Excitation) Fluorescence Resonance Energy Transfer & Time-Correlated Single Photon Counting	pag. 110
4.2.5.3 Metal-Enhanced Fluorescence & Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy	pag. 112

Capitolo V: CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	pag. 121
BIBLIOGRAFIA	I-XXIII

Abstract

Celiac disease is a particular food intolerance leading to chronic autoimmune enteropathy to the detriment of the small intestine. It is a disease particularly prevalent in the western world and although there is a clear risk of hereditary, inheritance does not follow the classic Mendelian pattern, suggesting a multigenic and/or multifactor etiopathogenesis, fundamentally linked to two factors: an intrinsic to the patient, represented by genetic predisposition, which is mostly tied to gene HLA DQ2/8; an exogenous, or better, environmental, related to intake, through diet, of gluten. This protein component is contained in various cereals. The toxic fraction of this protein is represented by the alcohol-soluble component: gliadin, characterized by the frequent recurrence of the tetra peptide -gln-gln-gln-pro-, now considered as the detrimental agent of the disease. In fact, the serious injuries to the mucosa of the small intestine caused by intolerance to gluten, are resolved only after the elimination of such nutrient from the diet. As of now, the definitive diagnosis of celiac disease can only be obtained through histopathological examination of the jejunal mucosa designed to detect villous atrophy. However, the possibility to have more practical and less invasive method than histopathology, may represent an important perspective in order to perform screening mass and the follow-up of celiac disease. To this end, different ELISA tests (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) were developed for the determination of anti-tissue transglutaminase antibodies (anti-tTG Ab), representing a serological marker for celiac disease (Dieterich W. et al., 1997, 2001). Therefore, the development of a easier and faster quantitative analysis system, such as a protein biosensor that exploits the principles of fluorescence, for the determination of anti-tTG Ab, is considered very useful and innovative enough to deserve the priority of future research work. The key aspect of this technology is encapsulated in the ability to produce a light signal, when these antibodies are detected in serum or saliva of the celiac patients. This will help the patients with the follow-up of the disease in a simple and quick way. In particular, this work has provided for the development of a competitive fluorescent assay based on simultaneous application of two methods: the "FRET" (Fluorescence Resonance Energy Transfer) and the technique "molecular beacons". These methods use the presence of appropriate fluorescent

probes conjugated to two different biological molecules, in this case the *Guinea pig* liver transglutaminase (gptTG) and anti-tTG Ab from rabbit and take into account the “Förster distance” to induce energy transfer between the fluorophores used. First, the “FRET” assays were carried out to study the Ag-Ab interactions in solution by acquiring steady-state and time-resolved (lifetime) fluorescence measurements. After that, in order to simulate the regular immuno-enzymatic assays performed on multi-well plates, these measurements were performed on labeled samples, not covalently immobilized on glass slides, in developing a fluorescence “front-face” assay. This configuration with the help of Fluorescence Confocal Microscopy has allowed us to study the interactional dynamics of single molecules of Ag bound to Ab anti-tTG. Furthermore, in order to optimize the technique of fluorescence, to obtain a low background, a high sensitivity and specificity, samples were first immobilized on glass slides coated with metallic silver particles, forming branched structures visible by naked eye (fractal-like structures). This is because it has been observed that the spectral characteristics of fluorophores, can change significantly when they are in close proximity to a metal surface, so as to produce an increase in the emission of fluorescent signal that can be used to improve the quantitative determination of bioanalytes. In parallel, in order to reduce the high cost of commercially available preparations of gptTG, the experimental work involved the creation of an appropriate strategy for cloning the tTG gene from *Guinea pig* liver and an efficient system for recombinant proteins expression in a strain of *Escherichia coli*. The results show that the choice of the fluorophores used to label the commercial Ag and rabbit anti-tTG Ab has been corrected. In fact, there was the Resonance Energy Transfer between immunoreagents selected, a phenomenon on which is based the fluorescence assay suggested. Moreover, the principle of Metal-Enhanced Fluorescence was useful to improve the bioanalyte detection, recording a significant increase in single molecule fluorescence emission of labeled Ag, immobilized on glass slides coated with silver fractals-like structures, improving the sensitivity of the fluorescent assay designed. By contrast, more studies are needed to optimize the conditions for expression of recombinant gptTG in *E. coli*, since the amount of soluble enzyme produced in the presence of chemical chaperones is not enough to go to the purification procedure. Therefore, the use of exogenous molecular chaperones as a support to induce

proper folding of protein structure might be a good strategy to obtain large amounts of soluble recombinant protein in *E. coli*.

Sommario

La celiachia è una particolare intolleranza alimentare che comporta un'enteropatia autoimmune cronica a danno dell'intestino tenue. È una malattia particolarmente diffusa nel mondo occidentale e sebbene ci sia una chiara predisposizione familiare, l'ereditarietà, non segue i classici pattern mendeliani, suggerendo un'eziopatogenesi multigenica e/o multifattoriale fondamentalmente legata a due fattori: uno intrinseco al paziente, rappresentato dalla predisposizione genetica, che è per lo più legata al gene HLA DQ2/8; uno esogeno o, meglio, ambientale, legato all'assunzione, attraverso la dieta, di glutine, componente proteica contenuta in diversi cereali. La frazione tossica di tale proteina è rappresentata dalla componente alcool solubile: la gliadina, caratterizzata dalla frequente ricorrenza del tetrapeptide -gln-gln-gln-pro-, ora considerato l'agente lesivo della malattia. Infatti, le gravi lesioni alla mucosa dell'intestino tenue causate dall'intolleranza al glutine, regrediscono solo dopo l'eliminazione di tale nutriente dalla dieta. Oggi, la diagnosi definitiva di celiachia può essere ottenuta solo attraverso l'esame istopatologico della mucosa digiunale volto a rilevare l'atrofia dei villi intestinali. Tuttavia, la possibilità di avere metodi più pratici e meno invasivi rispetto a quelli istopatologici, può rappresentare una prospettiva importante al fine di eseguire "screening" di massa e per il "follow-up" della malattia celiaca. Da questo punto di vista, diversi sistemi ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) sono stati messi a punto per il dosaggio di anticorpi anti-transglutaminasi tissutale (Ab anti-tTG), rappresentanti un marker sierologico per la celiachia (Dieterich W. et al., 1997; 2001). Perciò, lo sviluppo di un sistema di analisi quantitativo più semplice e rapido, quale un biosensore proteico, che sfrutti i principi della fluorescenza, per la determinazione degli Ab anti-tTG, è da considerarsi molto utile e innovativo tanto da rappresentare l'obiettivo prioritario del seguente lavoro di ricerca. L'aspetto chiave di tale tecnologia è racchiuso nella capacità di produrre un segnale luminoso, quando sono rilevati tali anticorpi nel siero o nella saliva dei pazienti affetti, tanto da metterli in condizione di seguire il "follow-up" della malattia in modo semplice e immediato. In particolare, tale lavoro ha previsto la messa a punto di un saggio fluorescente competitivo basato sulla simultanea applicazione di due metodologie: la "FRET" (Fluorescence Resonance Energy

Transfer) e la tecnica “molecular beacons”. Queste metodiche utilizzano la presenza di opportune sonde fluorescenti coniugate a due differenti molecole biologiche, nel caso specifico la transglutaminasi da fegato di *Guinea pig* (gptTG) e gli anticorpi anti-tTG da coniglio e tengono conto della “distanza di Förster” in cui avviene trasferimento di energia tra i fluorofori utilizzati. In un primo momento i saggi di FRET, volti a studiare le interazioni Ag-Ab in soluzione, sono stati eseguiti mediante l’acquisizione di misure di fluorescenza statica (steady-state) e risolta nel tempo (lifetime). Dopo di che, al fine di simulare i regolari saggi immuno-enzimatici eseguiti su piastre multi-pozzetto, tali misure sono state effettuate sui campioni marcati, immobilizzati in maniera non covalente su vetrino, in modo tale da sviluppare un saggio fluorescente di tipo “front-face”. Tale configurazione con l’ausilio della Microscopia Confocale in Fluorescenza ha permesso di studiare le dinamiche interazionali di singole molecole di Ag legate agli Ab anti-tTG. Inoltre, al fine di ottimizzare la tecnica di fluorescenza, in modo da ottenere un basso “background”, un’alta sensibilità e specificità, i campioni sono stati immobilizzati su vetrini prima ricoperti con particelle metalliche d’argento, formanti strutture ramificate visibili a occhio nudo (fractal-like structures). Questo perché è stato osservato, che le caratteristiche spettrali dei fluorofori, possono cambiare in maniera rilevante quando si trovano in stretta vicinanza di una superficie metallica, tanto da produrre un aumento dell’emissione del segnale fluorescente che può essere utilizzato per migliorare la determinazione quantitativa di bioanaliti. Parallelamente, al fine di abbattere gli alti costi delle preparazioni di gptTG commercialmente disponibili, l’attività sperimentale ha previsto la realizzazione di un’opportuna strategia di clonaggio del gene della tTG da *Guinea pig* e di un efficiente sistema di espressione della proteina ricombinante in un ceppo batterico di *Escherichia coli*. I risultati ottenuti hanno dimostrato che la scelta dei fluorofori utilizzati per marcare l’Ag commerciale e gli Ab-anti tTG da coniglio è stata corretta. Infatti, si è verificato il trasferimento di energia di risonanza tra gli immunoreagenti selezionati, fenomeno su cui si basa il saggio a fluorescenza proposto. Inoltre, il principio della fluorescenza aumentata dai metalli è stato utile a migliorare la rilevazione del bioanalita d’interesse, registrando un aumento considerevole dell’emissione di fluorescenza di singole molecole di Ag marcato, immobilizzato su vetrino ricoperto da nanostrutture d’argento ramificate,

migliorando la sensibilità del saggio fluorescente progettato. Per contro, sono necessari altri studi per ottimizzare le condizioni di espressione della gptTG ricombinante in *E. coli*, poiché la quantità di enzima solubile prodotta, in presenza di chaperoni chimici, non è sufficiente per passare alla procedura di purificazione. Perciò, l'uso di chaperoni molecolari esogeni, come supporto per indurre un corretto ripiegamento della struttura proteica, potrebbe essere una buona strategia per ottenere elevate quantità di proteina solubile ricombinante in *E. coli*.

Capitolo I

LA MALATTIA CELIACA

1.1 Storia clinica

La malattia celiaca è un'enteropatia che interessa soprattutto il tratto prossimale dell'intestino tenue e può essere definita come un'intolleranza permanente al glutine, componente proteica della farina di frumento, orzo, segale e avena che insorge in soggetti geneticamente predisposti (Auricchio S. et al., 1988). La nozione che il grano possa essere nocivo per molti individui si è fatta strada con notevole difficoltà sia in ambito scientifico sia nella cultura occidentale. Non è stato facile, infatti, attribuire proprietà tossiche a una sostanza contenuta in alimenti che hanno costituito per secoli una delle fonti primarie nell'alimentazione dell'uomo (Auricchio S. et al., 1988). Nell'ultimo secolo diversi fattori ambientali hanno fatto emergere il problema dell'intolleranza al glutine, anche se in realtà si ritiene che la malattia celiaca probabilmente si sia manifestata in seguito ad uno dei primi cambiamenti ambientali associati con la civilizzazione dell'uomo, in altre parole lo sviluppo dell'agricoltura 10.000 anni fa nella Mezzaluna Fertile e l'introduzione dei cereali nella dieta dell'uomo.

Dal punto di vista storico Celso, nel 1° secolo a.C., introdusse il termine *Koiliakos*, dal greco: "Relativo all'intestino", nel rappresentare malattie intestinali con forte diarrea. Aristeo di Cappadocia, vissuto nel 2° secolo d.C., riconobbe il ruolo chiave della dieta nell'insorgenza della malattia celiaca. Egli fornì la prima descrizione delle manifestazioni comuni quali: diarrea cronica, dolore e distensione addominale, cachessia progressiva, e riconobbe loro l'origine intestinale, assegnando così il nome alla malattia. Nel 1888 Gee descrisse la malattia nei bambini affermando che la dieta era l'aspetto principale per una corretta terapia. Nel 1918 Still segnalò, in certi malassorbimenti, l'azione dannosa dell'alimentazione con pane. Nel 1932 l'olandese Thjsend osservò che l'alimentazione coatta con tuberi (per guerre e carestia) faceva guarire i celiaci. Solo agli inizi degli anni '50, Dicke, un giovane pediatra olandese, riconobbe il ruolo scatenante delle proteine contenute nei cereali, nell'insieme chiamate "glutine", nell'insorgenza della malattia celiaca. Egli osservò, infatti, che i suoi pazienti erano

migliorati durante il periodo bellico, quando erano costretti a nutrirsi con una dieta a base di patate, ma che le loro condizioni di salute erano nuovamente peggiorate al termine del conflitto, quando essi avevano ripreso a consumare pane e altri alimenti contenenti glutine (Dicke W.K. et al., 1953). Dicke associò, dunque, l'insorgenza dei sintomi patologici con il consumo di pane di grano e cereali e diede la prima e tuttora unica cura della malattia, la dieta priva di glutine (Van de Kamer J. et al., 1953). In seguito, molti pezzi del puzzle della patogenesi della celiachia sono stati progressivamente assemblati. Nel 1957, lo sviluppo della "capsula Crosby" permise Shiner di esaminare biopsie duodenali e dimostrare la tipica atrofia dei villi con ipertrofia delle cripte associata a questa malattia (Sakula J. & Shiner M., 1957). Questo quadro istologico è stato completato nel 1971 da Ferguson, che evidenziò una caratteristica della celiachia, l'infiltrazione massiva da parte dei linfociti nell'epitelio dell'intestino tenue (Ferguson A. & Murray D., 1971). All'inizio degli anni '60, studi familiari rilevarono il contributo di fattori di predisposizione genetica (Carter C. et al., 1959); il ruolo chiave di questi è stato definito con la dimostrazione di un tasso di concordanza del ~ 75% in gemelli monozigoti rispetto al 20% nei gemelli dizigoti e del 10% nei parenti di primo grado dei pazienti affetti (Greco L. et al., 2002). Nel 1970, l'identificazione delle immunoglobuline G (IgG) e degli anticorpi IgA contro il glutine insieme con un autoantigene più tardi identificato come transglutaminasi tissutale II (tTG), nel siero dei pazienti affetti da celiachia (Dieterich W. et al., 1997), fornì nuovi strumenti diagnostici e la prima evidenza che la malattia celiaca è immunologicamente guidata, un concetto supportato rapidamente dalla scoperta che il maggiore fattore genetico predisponente è nel complesso dell'Antigene Leucocitario Umano (HLA). L'identificazione dell'eterodimero HLA-DQ2, come il più importante fattore di predisposizione (Howell M.D. et al., 1986; Sollid L.M. et al., 1989) e del suo ruolo nello sviluppo di una risposta infiammatoria intestinale delle cellule T CD4⁺ al glutine è stato il passo successivo e la pietra miliare, stabilendo così un legame decisivo tra il fattore ambientale scatenante e il gene principale predisponente (Sollid L.M. et al., 2000). Tuttavia, il puzzle resta ancora incompleto. Non è ancora chiaro il motivo per il quale solo un sottoinsieme d'individui con HLA a rischio sviluppa la malattia, e perché alcuni lo fanno precocemente nella prima infanzia,

subito dopo la loro esposizione al glutine, mentre altri sviluppano la malattia molto più tardi in età adulta.

1.2 Epidemiologia

La celiachia è oggi considerata nei paesi occidentali una comune causa di malassorbimento. Esistono differenze nell'incidenza geografica che possono essere messe in relazione, per esempio, all'età d'introduzione del glutine nella dieta. Infatti, una sua precoce introduzione nella dieta potrebbe alterare l'equilibrio di un sistema immunitario non ancora completamente maturo.

Circa la diffusione della malattia, nel mondo occidentale i dati non sembrano esser molto diversi da quelli italiani. Nel continente asiatico, invece, vi è un'incidenza inferiore, forse in rapporto al tipo di dieta. In passato si riteneva che la celiachia fosse appannaggio esclusivo delle popolazioni europee e di tutti quei paesi in cui gli europei erano emigrati, includendo l'America settentrionale e l'Australia. Anche i caratteri somatici, quali i capelli biondi e gli occhi azzurri, erano descritti come tipici dei soggetti affetti da malattia celiaca. La celiachia era pressoché sconosciuta tra i neri di America e in Oriente. Anche questo quadro, da un punto di vista epidemiologico si sta modificando. Grazie ai test ematochimici di recente introduzione, la frequenza della celiachia si sta modificando oltre che negli Stati Uniti, dove la prevalenza della malattia è stata sempre più bassa dell'Europa (oggi 1:250 abitanti), anche in aree del mondo quali l'Africa del Nord, il Medio Oriente e l'India, tanto da poter affermare che in questi anni si sta assistendo alla “globalizzazione” della celiachia. Infatti, la diffusione geografica della malattia ricalca quella dei cereali contenenti il glutine. L'utilizzo del frumento nei paesi in via di sviluppo è notevolmente aumentato negli ultimi anni, a oggi il consumo medio di frumento in questi paesi è di 63.4 Kg/anno contro 29.3 Kg/anno nel 1961. Questa tendenza potrebbe essere la fase iniziale di una “pandemia” celiaca legata alla progressiva occidentalizzazione, dal punto di vista alimentare, della popolazione mondiale. Negli indiani Punjabis la celiachia è conosciuta come “diarrea estiva”, infatti, l'aumento dei sintomi legati alla celiachia, si accentua prevalentemente nel periodo estivo. Questo fenomeno è legato al fatto che le focacce preparate nel periodo invernale sono fatte con la farina di mais, mentre quelle estive sono preparate con la farina di grano. In un recente lavoro Mohindra

ha mostrato come l'incidenza di celiachia in 246 bambini indiani con diarrea e scarso accrescimento era del 16.6% (Mohindra S. et al., 2001). In Iran, in un gruppo di 100 pazienti con diarrea cronica e sottoposti al test degli EMA (Ab anti-endomisio), la prevalenza della malattia era di circa il 20% (Shahbazkhani B. et al., 2000). In Algeria è stata riportata la più alta frequenza mondiale di associazione tra diabete mellito di tipo I e celiachia (16-20%) (Boudraa G. et al., 1996). I Saharawi, popolazione di origine arabo-berbera che vive in Algeria, presentano una prevalenza della celiachia non riscontrabile in altre popolazioni. In uno studio condotto su 989 bambini di età media di 7.4 +/- 3.8 anni, è stata diagnosticata la celiachia nel 5.6% dei soggetti contro la frequenza europea di circa 0.5-1% (Catassi C. et al., 1999). In questi bambini la sintomatologia è generalmente quella classica (diarrea, ritardo della crescita, distensione addominale e anemia severa). In alcuni casi sono stati riscontrati valori di emoglobina di 3 gr %, quasi al limite della compatibilità con la vita (Raetsch I.M. et al., 2001). Negli anni passati, la prevalenza della malattia celiaca in Europa riportava medie oscillanti tra 1:1000 e 1:4000. Un recente studio Inglese ha riscontrato una prevalenza della patologia nel Regno Unito pari a 1:300, (Hin H. et al., 1999) mentre nell'Irlanda si osservava una prevalenza pari a 1:150 (Mylorte M. et al., 1973). Nello stesso periodo indagini più ampie di "screening" di massa svolte nel nostro paese mostravano un'incidenza in Sicilia di un caso su 600 nati (1992). In seguito Bottaro e collaboratori (1993) osservarono un'incidenza di 1:300 nati. Nelle Marche su di un campione costituito da 5280 studenti, di età compresa tra gli 11 e i 15 anni, è stata osservata una prevalenza di 1:199 nati. Tali risultati clamorosi hanno trovato conferma da un'indagine multicentrica nazionale, svoltasi nel periodo 1992-1995 nell'ambito della Società Italiana di Gastroenterologia ed Epatologia Pediatrica (SIGEP) su un campione di 17201 studenti del Nord, Centro e Italia meridionale, che ha riportato un'incidenza di 1:184 nati. In Italia, nel 1990 si riteneva che vi fosse un caso ogni 1000 abitanti. Lo screening del '94 fece rilevare che ve n'era 1 ogni 200. Oggi sappiamo che l'incidenza della malattia celiaca è di 1 ogni 100/150 abitanti con un rapporto femmine/maschi di 2:1 (Ciclitira P.J., 2001). Perciò, in Italia, vi sono all'incirca mezzo milione di celiaci. Da una recente indagine promossa dall'AIC (Associazione Italiana Celiachia), in una famiglia in cui vi è un celiaco, nel 17% circa dei casi ve n'è un altro. Ciò indica l'importanza

dell'estensione dello "screening" riguardante i familiari dei celiaci. Sempre dalla stessa indagine risulta che su 584 celiaci con almeno un familiare con la stessa malattia, in circa il 55% dei casi è un parente di primo grado, ma circa il 40% negli altri gradi di parentela. Questo dato ci induce a pensare che probabilmente lo "screening" familiare non debba essere limitato solamente ai parenti di primo grado. Inoltre, prima dell'introduzione della dieta priva di glutine si aveva una mortalità legata alla malattia celiaca pari al 10-30%; dopo l'introduzione della dieta aglutinata la mortalità è scesa allo 0.4% (Sheldon W., 1969).

1.3 Eziologia

Sebbene ci sia una chiara predisposizione familiare alla celiachia (Myllotte M. et al. 1974), l'ereditarietà non segue i classici pattern mendeliani, suggerendo la possibilità di un'eziopatogenesi multigenica e/o multifattoriale. La concordanza nei gemelli monozigoti, come detto, è solo del 75% (Walzer-Smith J.A., 1973), suggerendo quindi che i fattori ambientali esterni giocano un ruolo importante nella patogenesi della malattia. Infatti, essi sono rappresentati dal glutine, la componente proteica delle farine di frumento, orzo, segale ed avena, considerato ormai da tempo il fattore scatenante della malattia celiaca. Insieme all'ingestione di glutine, c'è da considerare tutta una serie di altri fattori ambientali che contribuiscono all'insorgenza della malattia celiaca. In primo luogo, il contenuto di glutine nella farina, che nell'era agroindustriale è aumentato notevolmente. Sono stati selezionati, infatti, i semi in grado di conferire alla farina eccellenti proprietà di panificazione, qualità che è migliorata dall'elevato contenuto in glutine. Con queste premesse è diventata relativamente comune una condizione che si presenta dopo le prime somministrazioni di frumento allo svezzamento, caratterizzata da un danno della mucosa intestinale, da malassorbimento, da diarrea e da un difetto di crescita (Maki M. & Collin P., 1997). È importante menzionare che anche la scelta del periodo d'introduzione del glutine nella dieta dei neonati rappresenta un fattore critico nella patogenesi della celiachia. Un recente studio, infatti, dimostra che l'esposizione al glutine nei primi tre mesi o dopo il settimo mese di vita, incrementa il rischio dello sviluppo della patologia (Norris J.D. et al., 2005). Inoltre, è stato notato che la graduale integrazione di cibi contenenti glutine nella dieta di neonati nutriti in contemporanea anche con latte materno, sembra dare un effetto

protettivo, riducendo i rischi d'insorgenza della malattia, in confronto a bambini che sono stati esclusivamente nutriti al seno materno per i primi sei mesi di vita e soltanto dopo lo svezzamento entrano a contatto con il glutine (Ivarsson M. et al., 2002; D'Amico N. et al., 2005).

L'importanza dei fattori genetici nella patogenesi della sprue celiaca, per contro, è testimoniata da studi condotti su familiari di pazienti celiaci che hanno rilevato una prevalenza della patologia pari al 10% tra i familiari di primo grado e del 30% se si considerano fratelli e sorelle HLA (Human Leukocyte Antigen) identici (Corazza G.R. et al., 1992). Questi dati suggeriscono che la componente genetica è per lo più legata al MHC (Major Histocompatibility Complex) (Mearin M.L. et al., 1983; Tosi R. et al., 1983). Altra prova dell'importanza dei fattori genetici è data dall'esistenza di un'associazione tra malattia celiaca e geni che codificano per le molecole HLA di classe II. Infatti, oltre il 90% dei pazienti celiaci presenta la molecola HLA-DQ2. I pazienti che non presentano la molecola DQ2 esprimono, nella maggior parte dei casi, la molecola DQ8 (Sollid L.M. et al., 1989; 2005). Inoltre, è stata formulata anche l'ipotesi che un agente ambientale esterno, come un virus, possa essere implicato nell'insorgenza della malattia. Tale osservazione, in principio, è stata supportata da studi epidemiologici per i quali l'incidenza della celiachia nei bambini mostrava una diminuzione significativa in regioni precedentemente conosciute per avere un alto tasso d'incidenza (Littlewood J.M. et al., 1980). In seguito, da un recente studio, è emersa l'ipotesi che l'innescò della malattia celiaca possa avvenire, su soggetti geneticamente predisposti (HLA-DQ2/DQ8), conseguentemente a una comune infezione da rotavirus con risposta verso la proteina «Vp7» del rotavirus, uno dei più frequenti agenti eziologici che causa enteriti nei neonati e nei bambini in molte parti del mondo (Lars C. et al., 2006). Gli anticorpi anti-peptide celiaco di pazienti affetti, attraverso un meccanismo di mimetismo molecolare, riconoscerebbero il prodotto virale suggerendo, quindi, un possibile legame tra l'infezione da rotavirus e la malattia celiaca (Zanoni G. et al., 2006). Allo stato attuale, però, domina l'idea che l'ipotesi del fattore virale, per quanto elegante, non poggi su basi scientifiche concrete (Figura 1).

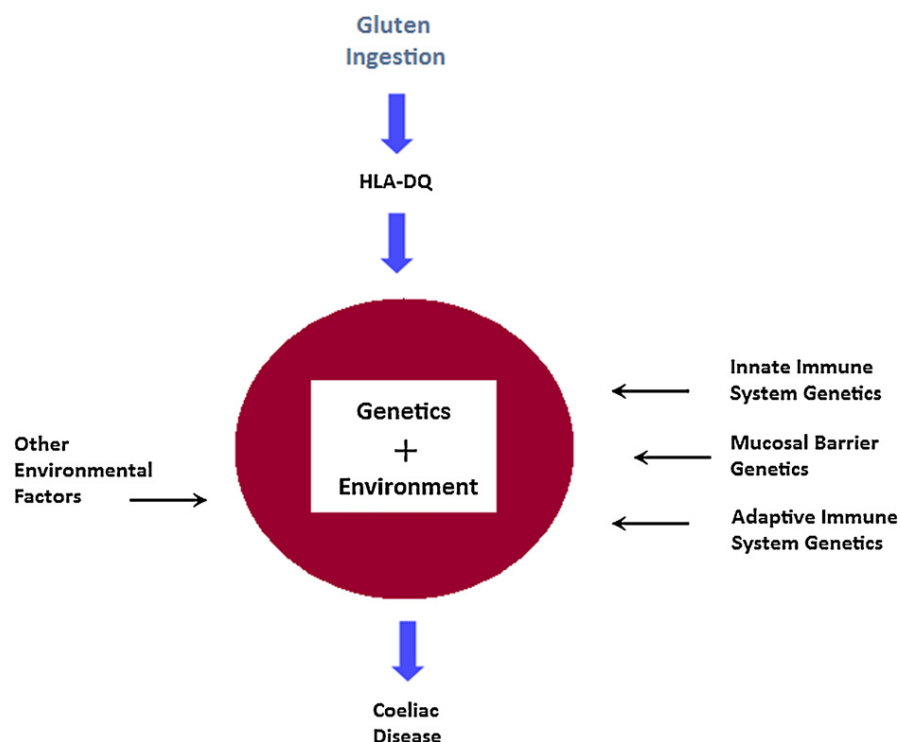


Figura 1. L'associazione HLA-DQ con la malattia celiaca. L'aplotipo HLA-DQ2/DQ8 è necessario ma non sufficiente per lo sviluppo della malattia. Infatti, una combinazione di altri fattori genetici che influenzano la barriera mucosale, il sistema immunitario innato o adattativo contribuisce verosimilmente allo sviluppo della malattia. È ormai noto che l'ingestione di glutine è il fattore ambientale necessario per l'insorgenza della patologia, ma al di là di questo un numero di altri fattori, così come il momento della prima ingestione di glutine nell'infanzia e la cessazione del nutrimento al seno materno possono influenzare lo sviluppo della malattia. Non ultima l'ipotesi alternativa non legata a fattori genetici quanto piuttosto al cointervento di altri fattori ambientali, in particolare virus.

1.3.1 Fattori ambientali: il glutine

E' noto ormai da qualche tempo che il fattore scatenante della malattia celiaca è rappresentato dal glutine, la componente proteica della farina di frumento, orzo, segale e avena. La struttura esatta della frazione di glutine, responsabile dei danni nella sprue celiaca, rimane ancora poco chiara. I chicchi di grano hanno tre parti principali che sono separate dalla macinazione: la buccia esterna o crusca, il germe, e l'endosperma o farina bianca, che costituisce, in peso, il 70%-72% del grano intero e contiene le componenti proteiche tossiche (Ciclitira P.J., 2001). Le proteine dei

cereali si possono dividere in due gruppi principali: le prolamine, frazione solubile in etanolo e le glutenine, insolubili in alcool. Le prolamine dei diversi cereali sono denominate gliadine se provengono dal frumento, segaline dalla segale, ordeine dall'orzo e avenine dall'avena. Inoltre, tali proteine sono suddivise in classi secondo le loro caratteristiche di solubilità: le gliadine sono solubili nel 40%-90% di etanolo e le glutenine sono insolubili in soluzione acquosa a pH neutro, salino, o in etanolo. Le gliadine possono essere ulteriormente suddivise nelle subfrazioni: alfa (α), beta (β), gamma (γ), e omega (ω) sia in base alla loro relativa mobilità elettroforetica, sia in base alla sequenza amminoacidica presente all'estremità N-terminale, per quanto riguarda le frazioni α , β e ω . Esse sono costituite da singole catene polipeptidiche, di peso molecolare compreso tra i 30.000 e 75.000 Dalton e sono caratterizzate da un alto contenuto di glutammina (35%) e prolina (25%), in altre parole 32-56 glutammine e 15-30 proline ogni 100 residui amminoacidici (Ciclitira P.J., 2001) (Figura 2).

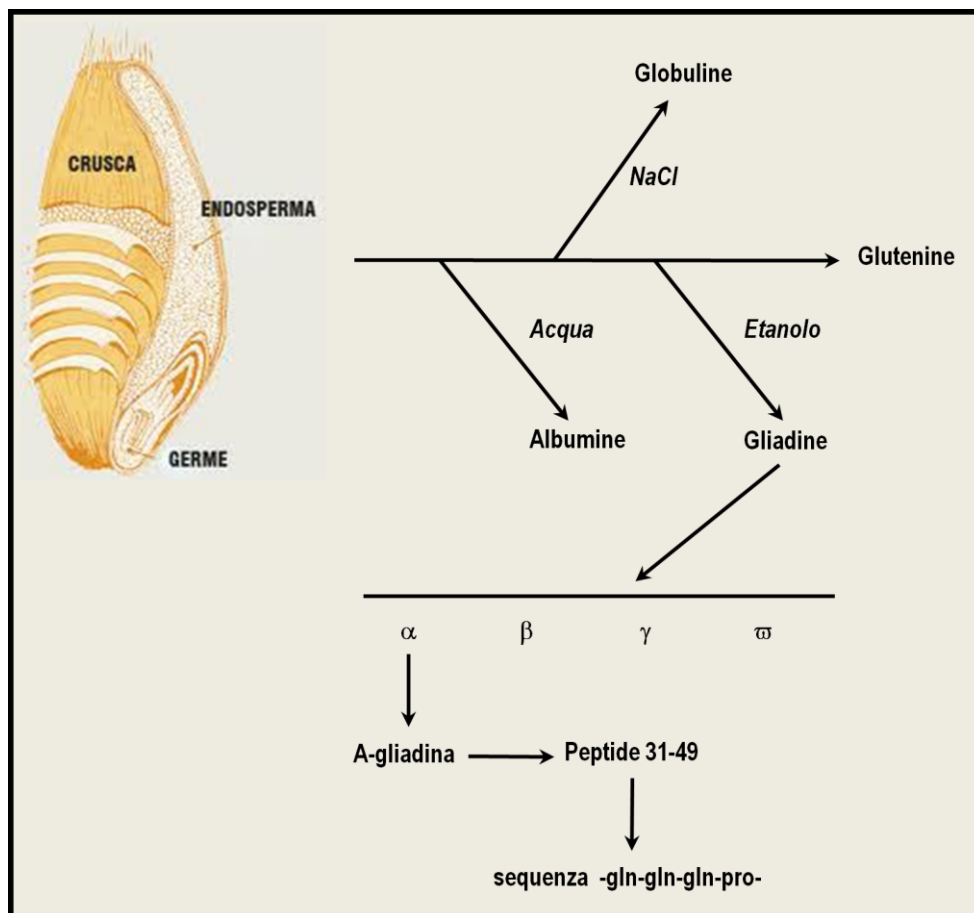


Figura 2. Dal chicco di grano alla sequenza tossica -gln-gln-gln-pro- del glutine.

Sia le gliadine sia le glutenine contengono ponti disolfuro intracatena e mostrano una scarsa solubilità in acqua. Inoltre, le glutenine sono ampiamente legate da ponti disolfuro intercatena, formando quindi larghi aggregati proteici ulteriormente stabilizzati da legami idrogeno tra le ripetizioni ricche di glutammina (Bethune M.T. & Khosla C., 2008; Wieser H., 2007). Queste caratteristiche, utili per la preparazione del pane, sono le cause della tossicità di tali proteine per i pazienti celiaci. Dopo che Dicke (1953), determinò che la frazione tossica del grano risiedeva nell'endosperma del frumento, Frazer et al. (1959) purificarono e separarono i peptidi del grano dopo digestione fisiologica delle proteine e mostrarono che la maggior parte di questi peptidi sono tossici per i pazienti celiaci. Hekkens e collaboratori (1970) continuarono dimostrando che la α -gliadina esacerbava la sprue celiaca *in vivo* e più di recente che tutte le quattro subfrazioni della gliadina causavano la malattia sia *in vitro* (mediante l'utilizzo di colture di cellule enteriche) che *in vivo*. In seguito Kasarda et al. (1984) isolarono cloni di DNA complementare per la gliadina, sequenziarono e determinarono i 266 amminoacidi costituenti l'A-gliadina, che è una delle maggiori componenti dell' α -gliadina. Sfruttando la tecnica delle colture cellulari sono state, inoltre, identificate mediante digestione cianobromidica e triptica due sequenze (1.30 e 31.55) tossiche nell'ambito dell'A-gliadina. Tali sequenze sono state poi caratterizzate dalla frequente ricorrenza di due tetrapeptidi (-gln-gln-gln-pro- e -pro-ser-gln-gln-) la cui importanza è stata indirettamente confermata dalla loro assenza in cereali non tossici, quali mais e riso, e dal fatto di non poter essere ulteriormente digeriti da parte di enzimi attivi *in vivo*, quali pepsina, tripsina, chimotripsina, pancreatina ed endoproteinasi (De Ritis G. et al., 1988) (Figura 2). Tali oligopeptidi presentano omologia di sequenza con un pentapeptide identico alla proteina Elb dell'adenovirus umano 12, in genere isolato dal tratto gastrointestinale (Kagnoff M.F. et al., 1984). Sebbene siano state determinate tracce di anticorpi anti-adenovirus 12 in alcuni pazienti (Kagnoff M.F. et al., 1987), non si è riusciti a trovare una correlazione tra la presenza di sprue celiaca e i titoli anticorpali sierici contro la proteina Elb dell'adenovirus 12. Perciò, sebbene l'ipotesi dell'adenovirus fosse attraente e presentasse delle analogie con le teorie riguardanti la patogenesi delle malattie autoimmuni, essa non è più generalmente accettata.

La glutammina rappresenta il 35% degli amminoacidi nella gliadina e può essere determinante per la tossicità. Prova di questo sta nel fatto che la deamidazione completa della glutammina elimina le proprietà tossiche della gliadina, invece la parziale deamidazione causa un aumento di sensibilità da parte di cloni di cellule T glutine-sensibili a questo tipo di proteine (Ciclitira P.J., 2001).

Dopo la pubblicazione delle sequenze dell'A-gliadina (Kasarda D.D. et al., 1984), la tossicità delle varie sequenze del peptide sintetico derivato dall'A-gliadina è stata valutata in conformità a tecniche di coltura di organo utilizzando biopsie d'intestino tenue celiaco. La tossicità è stata dimostrata utilizzando sequenze di peptide corrispondenti ai residui 3-24, 25-55, 31-55 e 1-30 dell'A-gliadina (De Ritis G. et al., 1988). In seguito, Gjertson et al. (1994) riferirono che un peptide corrispondente ai residui amminoacidici 31-49 era riconosciuto dalle cellule T CD4⁺ isolate dal sangue periferico di un paziente con sprue celiaca se presentato dall'eterodimero HLA-DQ2. La somministrazione *in vitro* di tale peptide contenente la sequenza -gln-gln-gln-pro-, ma non quella -pro-ser-gln-gln-, riattivava le lesioni intestinali in un gruppo di celiaci in dieta priva di glutine. Sturgess et al. (1994) in seguito dimostrarono che questo stesso peptide esacerbava la sprue celiaca *in vivo* dopo infusione intraduodenale e usando una tecnica di biopsia multipla dell'intestino tenue. La sequenza del peptide 31-49 dell'A-gliadina è considerata l'agente lesivo della malattia celiaca. Inoltre, Molberg et al. (1998) hanno dimostrato che la transglutaminasi tissutale causa deamidazione selettiva delle proteine del glutine, aumentandone l'effetto stimolante sulle cellule T glutine-sensibili ottenute dall'intestino tenue di pazienti con sprue celiaca. E' stato ipotizzato, che ciò comporta la formazione di neoepitopi nelle proteine del grano, che sono quindi coinvolti nella patogenesi della malattia.

1.3.2 Fattori genetici

E' ormai chiaro che nella patogenesi della celiachia i fattori genetici sono importanti tanto quanto quelli ambientali (Green P.H. & Jabri B., 2003). Infatti, circa il 97% degli individui affetti presenta marcatori genetici sul cromosoma 6p21, chiamati HLA di classe II, (NIH Consensus Development Conference on Celiac Disease, 2005) i quali, con altre due grandi famiglie di geni denominate di classe I

(geni codificanti per il Tumor Necrosis Factor (TNF) e per le Heat Shock Protein 70) e di classe III (geni codificanti per l'HLA A, B e le molecole C), costituiscono il Complesso Maggiore d'Istocompatibilità (MHC), una regione di considerevole interesse dal punto di vista immunologico (Figura 3).

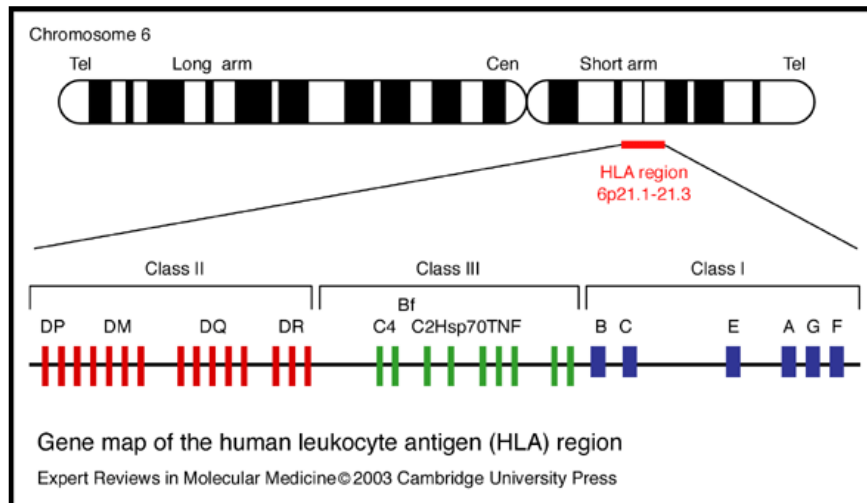


Figura 3. Mappa genica della regione HLA del MHC sul cromosoma 6.

I geni HLA sono molto importanti per il corretto controllo della risposta immune. Sono, infatti, le molecole HLA di classe II codificate da tali geni che, configurate come un calice sulla superficie delle cosiddette cellule presentanti l'antigene (cellule APC o macrofagi) presentano l'antigene al recettore posto sulla superficie dei linfociti T (Figura 4).

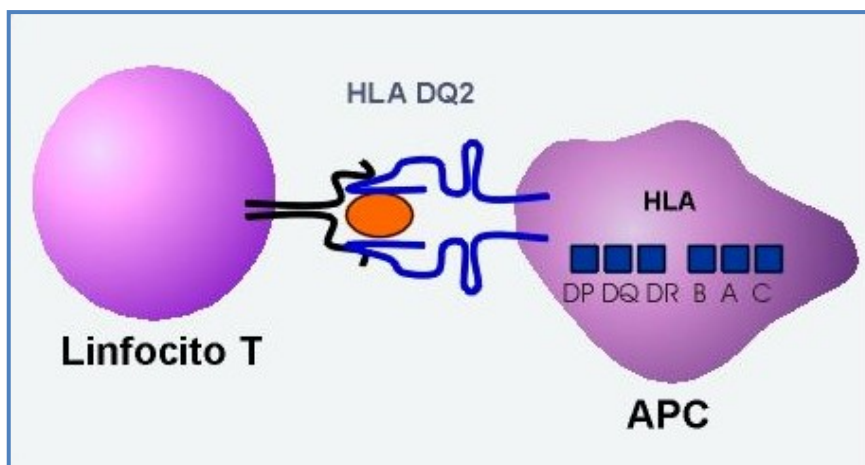


Figura 4. La risposta immune alla gliadina è controllata da almeno quattro gruppi di geni. Essi sono i geni predisposti alla conformazione del recettore per l'antigene sui linfociti T, quelli che regolano l'espressione di molecole HLA sulle cellule APC, i geni immunomodulanti e i cosiddetti preparatori.

La prima associazione genetica nello sviluppo della malattia celiaca si è stabilita agli inizi degli anni '70 con l'identificazione di un'associazione tra i geni codificanti le molecole HLA-B8, DR3, DR7 e l'insorgenza della patologia (Falchuk Z.M. et al., 1972; Keuning J.J. et al., 1976). Dopo è stato chiarito che l'associazione primaria è con i geni codificanti la molecola di classe II HLA-DQ2 e che le associazioni osservate in precedenza devono ritenersi secondarie a quelle con il DQ2, poiché HLA-B8, DR3, DQ2 sono in un forte "linkage disequilibrium" e sono ereditate sullo stesso aplotipo ancestrale (Price P. et al., 1999). L'eterodimero HLA-DQ2 contiene sia la catena α sia la catena β della molecola MHC ed è codificato dai geni DQA1*05 e DQB1*02, portati entrambi *in cis* sull'aplotipo DR3-DQ2 dello stesso cromosoma, in pazienti HLA-DR3 positivi, oppure *in trans*, cioè su cromosomi opposti di pazienti eterozigoti DR5/DR7, quando la catena α è codificata sull'aplotipo DR5-DQ7 di un cromosoma e la catena β sull'aplotipo DR7-DQ2 dell'altro cromosoma parentale (Sollid L.M. et al., 1989). Possedere l'aplotipo HLA-DQ2 rappresenta, quindi, un forte fattore di rischio per lo sviluppo della malattia celiaca. Uno studio su poco più di 1000 pazienti celiaci europei ha rilevato che circa in 90% di tali pazienti esprimeva l'aplotipo DQ2 (Karell K. et al., 2003). I pazienti rimanenti, per lo più italiani, negativi al DQ2, per contro, esprimevano l'aplotipo DQ8 o almeno la catena β dell'eterodimero DQ2 (Figura 5).

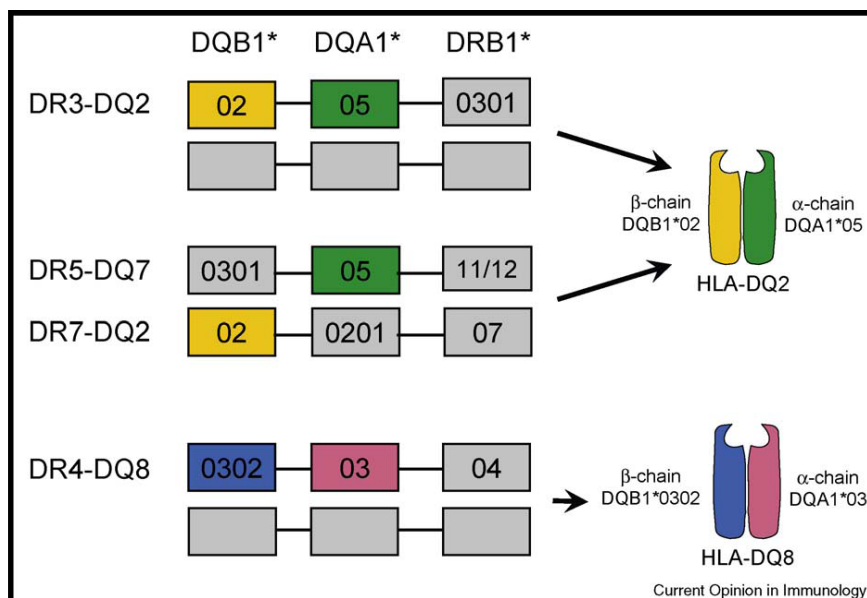


Figura 5. Associazione HLA nella celiachia. Una gran parte di pazienti celiaci esprime l'eterodimero HLA-DQ2 codificato dai geni DQA1*05 e DQB1*02. Questi due geni sono portati entrambi *in cis* sull'aplotipo DR3-DQ2, oppure *in trans* in individui che sono DR5-DQ7 e DR7-DQ2 eterozigoti. La maggior parte dei pazienti DQ2-negativi esprime DQ8 codificato sull'aplotipo DQ4-DQ8.

Si è visto, inoltre, che la traduzione sia dei geni DQ2 che DQ8 determinerebbe la sostituzione di un acido aspartico in posizione 57 della catena β e la presenza di una serina in posizione 75 della catena α tale da determinare un ruolo importante per il corretto legame con l'antigene (Karell K. et al., 2003; Mantovani V. et al., 1993). Questo condizionerebbe una non corretta presentazione dei peptidi della gliadina al recettore delle cellule T (TCR) scatenando un'alterata risposta immunologica nei suoi confronti. La stretta associazione della malattia celiaca con i geni di classe II suggerisce quindi, che l'insorgenza della malattia è mediata dall'interazione dell'antigene con il DQ2, con conseguente attivazione di specifiche cellule T. Nonostante ciò, la presenza dei geni DQ2 e DQ8 positivi è considerata una condizione necessaria ma non sufficiente per lo sviluppo della malattia. Una parte consistente della popolazione generale è, infatti, DQ2 e DQ8 positiva senza che ciò si traduca in una forma attiva di celiachia (Graham A. et al., 2009). Inoltre, la complessità della regione genica in questione, e la presenza di molteplici geni non HLA, unite alla diversa concordanza riscontrata tra gemelli monozygoti e

fratelli HLA identici (70% vs 30%), suggerisce che anche geni non appartenenti al Complesso Maggiore d'Istocompatibilità debbano essere implicati nella patogenesi della malattia celiaca (Goggins M. & Kelleher D., 1994). Ci sarebbero, infatti, oltre ai geni HLA, che partecipano al controllo della risposta delle cellule T verso l'antigene, geni preposti alla preparazione e al trasporto di quest'ultimo, geni che determinano il polimorfismo del recettore per l'antigene sui linfociti T (Niven M.J. et al., 1990; Roschmann E. et al., 1993) e geni immunomodulanti, che codificano per molecole di adesione, citochine e loro recettori, amplificando o restringendo la risposta immune in modo non antigene-specifico (Goggins M. & Kelleher D., 1994). Per identificare aree genomiche in associazione genetica con la celiachia, al di fuori del HLA, è stato eseguito uno studio basato sul polimorfismo di particolari sequenze di DNA dette microsatelliti, distribuite lungo l'intero genoma. In particolare, analisi di associazione genetica sono state eseguite per studiare i geni dei recettori α/β e γ/δ delle cellule T usando marcatori microsatellite, di 21 famiglie affette. Nessuna evidenza di associazione è stata riscontrata, dando conferma del ruolo preponderante della regione HLA nella genetica della sprue celiaca (Yiannakou J.Y. et al., 1999). Un'altra ipotesi di suscettibilità genetica non HLA correlato potrebbe essere determinata dal sistema d'inibizione-attivazione CTLA4-CD28. Il gene CTLA4 è un eccellente candidato nel coinvolgimento nella malattia celiaca, non solo perché è totalmente coinvolto nei meccanismi di soppressione delle risposte immuni ma anche perché è implicato, come variante genetica, in altre patologie autoimmunitarie, come il diabete di tipo I, aumentandone la suscettibilità (Van Heel D.A. et al., 2005). Nonostante ciò, studi più approfonditi sono necessari per valutare il possibile interessamento nella patogenesi della malattia celiaca di geni diversi dal HLA (Figura 6).

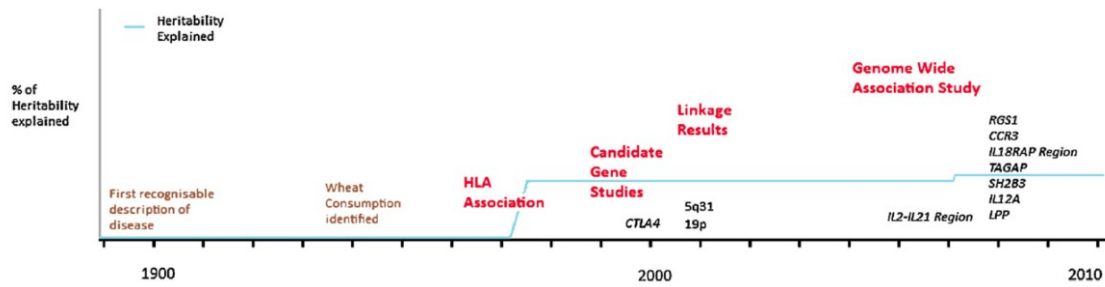


Figura 6. Spiegazione dell'ereditabilità celiachia. Nel corso degli ultimi 100 anni molti studi genetici sono stati eseguiti per la malattia celiaca. Nonostante ciò, solo il 34% dell'ereditabilità è stato spiegato. L'identificazione dell'associazione HLA-DQ2 nel 1970 spiega ancora la più alta percentuale di ereditabilità (~35%). Nuove varianti identificate dalla larga associazione del genoma hanno solo aggiunto un altro 3-4% di questa cifra lasciando una grande quantità del contributo genetico alla malattia inspiegabile. Questa cifra tuttavia, può essere previsto aumenti una volta che le varianti causali all'interno di questi loci sono state identificate.

Molto recentemente, studi genomici di larga associazione, basati sull'uso di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP), hanno gettato nuova luce sulla genetica di complesse malattie poligeniche. Queste analisi supportano la tesi che la maggior parte della variazione genetica, contribuente alla suscettibilità di una malattia, è data da molteplici varianti di effetti a debole risonanza (Dubois P.C. & Van Heel D. A., 2008). Due recenti studi fatti su un totale di circa 3.400 pazienti affetti da celiachia e 4.800 controlli provenienti dal Regno Unito, Irlanda e Germania hanno rivelato una forte associazione con otto diverse e nuove regioni cromosomiche. A oggi, però, solo una piccola percentuale di ereditabilità può essere spiegata per la malattia celiaca. Infatti, le nuove varianti identificate comprendono solo il 3-4% di tal ereditabilità, indicando che molte altre vere associazioni genetiche restano ancora da rilevare (Hunt K.A. et al., 2008; van Heel D. A. et al., 2007) (Figura 6).

1.4 Patogenesi

A oggi è stimato che i geni HLA spiegano circa il 40% della predisposizione genetica nella malattia celiaca e che la suscettibilità è principalmente associata con specifici alleli del MHC di classe II (Meresse B. et al., 2009). Dopo l'identificazione dell'associazione genetica tra la celiachia e i geni HLA, l'attenzione è stata

focalizzata sui meccanismi alla base di tale associazione, cercando così di spiegare la patogenesi della malattia. La regione HLA contiene tutti i geni del Complesso Maggiore d'Istocompatibilità umano, così come numerosi altri geni del sistema immunitario e non. La funzione primaria delle molecole MHC di classe II, come quelle HLA-DQ, è di presentare antigeni di derivazione esogena ai recettori posti sulla superficie cellulare delle cellule T. Nel caso della celiachia, le cellule presentanti l'antigene (APC) presentano i peptidi del glutine, provenienti dal lume intestinale, alle cellule T CD4⁺, innescando così una risposta immune di tipo adattativo. Raffinate analisi hanno permesso di decifrare come questo meccanismo è favorito dalle caratteristiche strutturali del glutine (Meresse B. et al., 2009).

1.4.1 Pre-processamento luminale e trasporto transepiteliale dell'antigene glutine

A differenza delle proteine esogene che devono essere processate intracellularmente nelle APC, prima di essere presentate alle molecole di classe II del MHC, gli antigeni della dieta, così come il glutine, seguono un particolare itinerario di processamento dell'antigene. Le proteine della dieta sono soggette a un lungo processamento pre-APC nel compartimento luminale, prima di incontrare le APC, che probabilmente sono localizzate nella lamina propria duodenale, giacché gli enterociti generalmente non esprimono molecole HLA-DQ (Scott H. et al., 1987; Kelly J et al., 1988). Gli enzimi luminali e dell'epitelio villare sono così efficienti che la maggior parte delle proteine della dieta sono rotte in frammenti così piccoli da essere immunogeniche. Tuttavia, la gliadina, a causa del suo alto contenuto di prolina, è notevolmente resistente a tale proteolisi e grossi frammenti peptidici restano intatti dopo la digestione enzimatica (Shuo-Wang Qiao L.I. et al., 2009). L'ipotesi dell'assenza di una peptidasi è stata avanzata per la prima volta da Frazer agli inizi degli anni '60 (Frazer A. et al., 1959). A oggi, non c'è alcuna evidenza di un difetto di predisposizione genetica, però Khosla e collaboratori hanno dimostrato che la mancanza di attività di un'endo-propil-peptidasi tra gli enzimi gastrici e pancreatici e sull'epitelio villare impedisce un attacco enzimatico efficiente dei domini ricchi di prolina nelle proteine del glutine, permettendo il rilascio di grossi peptidi che possono raggiungere intatti la superficie mucosale

(Bethune M.T. & Khosla C., 2008; Shan L. et al., 2002). Il frammento peptidico più esplicativo di tale processo è un peptide di 33 mer (dal greco “meros”= parte) prodotto dalla digestione della α 2-gliadina. Questo frammento immunomodulatore di 33 mer resta intatto anche dopo una prolungata incubazione in presenza di enzimi gastrici, pancreatici e della membrana dei villi intestinali (Shan L. et al., 2002). Esso contiene sei copie sovrapposte di tre diversi epitopi delle cellule T DQ2 ristrette, ed è riconosciuto dalle linee cellulari T di quasi tutti i pazienti celiaci adulti. Inoltre, questo peptide può legarsi alle molecole DQ2 direttamente sulla superficie delle APC e può così essere presentato alle cellule T senza il bisogno di ulteriori processamenti intracellulari (Qiao S.W. et al., 2004). Nonostante ciò, il modo in cui i peptidi immunogenici del glutine raggiungono la lamina propria dal lume intestinale resta ancora controverso. Evidenze sperimentali dimostrano che nella mucosa celiaca attiva, tali peptidi passano per via paracellulare a causa di un numero ridotto di giunzioni strette orizzontali e della conseguente diminuzione della resistenza transepiteliale (Clemente M.G. et al., 2003; Schulzke J.D. et al., 1998), formulando così l'ipotesi che un intestino più lasso permette un aumentato trasporto paracellulare della gliadina. Tuttavia altri studi dimostrano che la maggior parte del trasporto avviene per transitosi epiteliale, specialmente nella mucosa infiammata dei pazienti celiaci (Schumann M. et al., 2008; Matysiak-Budnik T. et al., 2008). Un'ampia frazione di peptide immunodominante da 33 mer è stata ritrovata intatta sul versante della lamina propria in mucose celiache attive, a differenza della completa degradazione riscontrata nei controlli e nelle biopsie di pazienti celiaci trattati (Matysiak-Budnik T. et al., 2003). Inoltre, Schumann et al. (2008) mostrarono che gli enterociti accumulavano questo frammento peptidico attraverso endocitosi e tale accumulo epiteliale era 10 volte più alto nei tessuti celiaci attivi in relazione ai controlli o ai pazienti celiaci trattati. E' interessante menzionare anche che l'interferone (IFN) γ , una citochina prevalente nella celiachia attiva, indebolisce la barriera epiteliale innescando l'internalizzazione di proteine delle giunzioni strette (Chiba H. et al., 2006) e che il trattamento con l'IFN γ di linee cellulari di epitelio intestinale aumenta la traslocazione del frammento di 33 mer (Schumann M. et al., 2008). Non ultima la zonulina, un peptide intestinale che è stato implicato nel regolamento delle giunzioni strette epiteliali e quindi nella permeabilità intestinale (Wang W. et al., 2000). La zonulina

probabilmente è liberata dall'epitelio intestinale come risposta ai digesti del peptide della α -gliadina, con conseguente disassemblaggio dei complessi delle giunzioni strette (Lammers K.M. et al., 2008). È noto che solo l'amministrazione apicale della gliadina induce questa risposta (Clemente M.G. et al., 2003). Un recente lavoro ha identificato che la gliadina si lega specificamente a CXCR3 sugli enterociti, inducendo un rilascio di zonulina indotto da MyD88, con una conseguente maggiore permeabilità epiteliale (Lammers K.M. et al., 2008) (Figura 7).

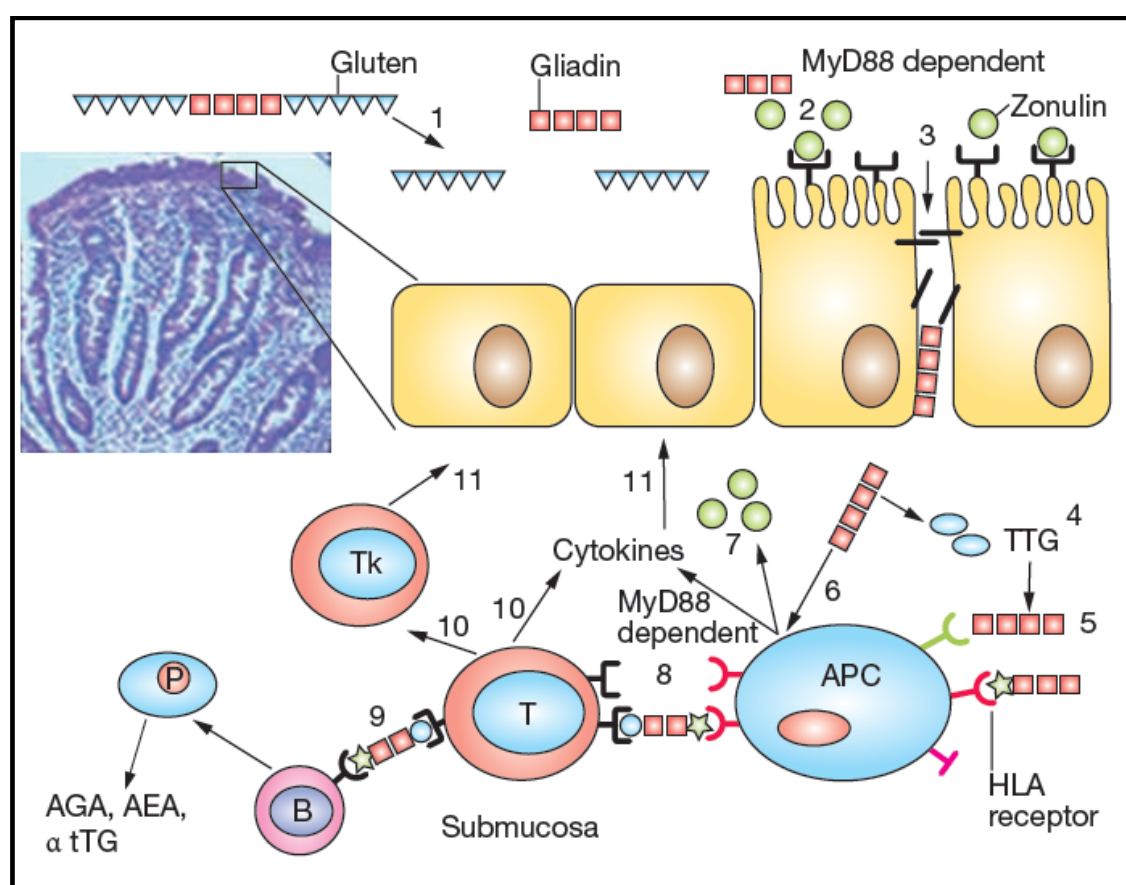


Figura 7. Proposta di un'anormale permeabilità intestinale nella patogenesi della malattia celiaca. La gliadina e i suoi frammenti immunomodulatori/infiammatori sono presenti nel lume intestinale (1), e inducono il rilascio di zonulina MyD88-dipendente (2). Il rilascio di zonulina provoca l'apertura di giunzioni strette e il passaggio della gliadina attraverso le barriere delle giunzioni strette in soggetti con alterazioni del sistema della zonulina (3). Dopo la deamidazione della transglutaminasi tissutale (4), i peptidi della gliadina si legano ai recettori HLA presenti sulla superficie delle APC (5). In alternativa, la gliadina può agire direttamente sulle APC (6), provocando il rilascio MyD88-dipendente sia di zonulina sia di citochine (7). I peptidi della gliadina

sono poi presentati ai linfociti T (8), processo che è seguito da una risposta immunitaria aberrante, sia umorale (9) che cellulo-mediata (10), in individui geneticamente predisposti. Questa interazione tra immunità innata e adattativa rappresenta il responsabile ultimo per il processo autoimmune che ha come bersaglio le cellule epiteliali intestinali, portando ai danni tipici intestinali della malattia celiaca (11).

La storia è ulteriormente complicata dalla constatazione che il frammento immunodominante da 33 mer della α -gliadina può passare attraverso le cellule epiteliali per transitosi, un processo migliorato dall'IFN γ (Schumann M. et al., 2008). Ciò sembra indicare che la gliadina può accedere alla superficie basale dell'epitelio e quindi interagire direttamente con il sistema immunitario, sia attraverso percorsi trans- sia paracellulari. La α -gliadina non coinvolge solo lo strato epiteliale, ma anche i leucociti. Vi sono prove ottenute dai monociti CD14⁺ derivati da sangue periferico che, la α -gliadina, può indurre l'IL-23 in un modo IL-1 β dipendente, una funzione che è inibita da un antagonista IL1-R (Harris K.M. et al., 2008). Un aumento di cellule CD14⁺ è stato prima osservato nella lamina propria dei pazienti con celiachia, anche se esse non sembrano essere le principali cellule presentanti l'antigene HLA-DQ2 (Raki M. et al., 2006). Recentemente è stato suggerito un meccanismo mediato da recettore per il trasporto transepiteliale della gliadina (Matysiak-Budnik T. et al., 2008). Il recettore della transferrina CD71 lega le IgA secrete ed è sovraespresso sulla superficie apicale degli enterociti nella mucosa celiaca attiva. Esperimenti di transitosi *ex vivo* suggeriscono che CD71 può mediare il trasporto dei complessi IgA-gliadina, un processo che può essere specificamente bloccato dalle IgA o da recettori CD71 solubili. Tuttavia, quanto l'associazione dei peptidi del glutine con le IgA anti-glutine luminali e la retrotransitosi dal polo apicale a quello basale dell'epitelio, possano contribuire alla transitosi *in vivo* resta ancora da dimostrare (Matysiak-Budnik T. et al., 2008). In aggiunta agli alti titoli di IgA anti-gliadina nei pazienti con celiachia attiva, sono anche presenti IgG anti-gliadina. Poiché il recettore Fc-neonatale (FcRn) è espresso in cellule epiteliali dell'intestino umano adulto (Israel E.J. et al., 1997) e media la transitosi dal lato apicale a quello basolaterale degli immunocomplessi IgG-antigene (Yoshida M. et al., 2004), il recettore FcRn può anche trasportare gli antigeni della gliadina attraverso la barriera epiteliale per transitosi di immunocomplessi IgG anti-gliadina/gliadina. Un'altra possibilità non ancora

provata è la campionatura dei peptidi del glutine dalla lamina propria delle cellule dendritiche. È stato dimostrato nei topi, ma non ancora nell'uomo, che queste cellule possono proiettare protrusioni tra le cellule epiteliali intestinali raggiungendo così il lume intestinale (Niess J.H. et al., 2005). Similmente, la campionatura dei peptidi del glutine dalle cellule dendritiche potrebbe avvenire preferenzialmente attraverso micropieghe cellulari specializzate che sono parte dell'epitelio follicolare associato alla mucosa del tessuto linfoide (Man A.L. et al., 2004).

1.4.2 Modificazioni post-traslazionali e legame al complesso HLA

Come detto in precedenza, il glutine in se ha un contenuto di proline e glutammine molto alto, per cui presenta pochissimi residui negativi necessari per il legame al sito HLA-DQ2 o DQ8 (Henderson K.N. et al., 2007). Per il legame, i peptidi del glutine, per meglio dire le prolamine, devono essere prima deamidate, cambiando i residui chiave delle glutammine in glutammati carichi negativamente (Molberg O. et al., 1998; Van de Wal Y. et al., 1998). Per la maggior parte degli epitopi derivati dal glutine, che sono stati identificati come molecole putative leganti il HLA-DQ2, la deamidazione operata dalla transglutaminasi (tTG) sembra essere un prerequisito per il legame e la presentazione dell'antigene alle cellule T Th1 nella malattia celiaca (Sjostrom H. et al., 1998).

1.4.2.1 Il ruolo della transglutaminasi nella malattia celiaca: la deamidazione dei peptidi del glutine

Questo enzima multifunzionale (tTG) è costitutivamente espresso nella lamina propria dell'intestino ed è transientemente attivato da danni tissutali (Siegel M. et al., 2008). La funzione fisiologica della tTG non è completamente chiarita, ma giocherebbe un ruolo importante nell'apoptosi cellulare (Autuori F. et al., 1998; Piacentini M. et al., 2002), nella stabilizzazione delle proteine della matrice extracellulare (ECM), (Greenberg C.S. et al., 1991; Jones R.A. et al., 1997) e nella riparazione dei tessuti, promuovendo il legame crociato delle proteine mediante la formazione di legami isopeptidici tra residui di lisina e glutammina (Fesus L. & Piacentini M., 2002). E' stato suggerito che la tTG legata al glutine può essere

riconosciuta da un aptene e stimolare la produzione di specifiche IgA. Questa ipotesi attraente per spiegare la comparsa di autoanticorpi specifici per la celiachia, tuttavia, non si è potuta dimostrare, anche se la scomparsa di tali autoanticorpi avviene con la dieta priva di glutine (Sollid L.M. et al., 1997). Un'altra attività enzimatica della tTG, come accennato in precedenza, è quella di deamidare la glutammina a carica neutra in acido glutammico carico negativamente, un'attività particolarmente efficiente sui motivi glutammina-X-prolina frequenti nelle prolamine (Vader L. et al., 2002) (Figura 8).

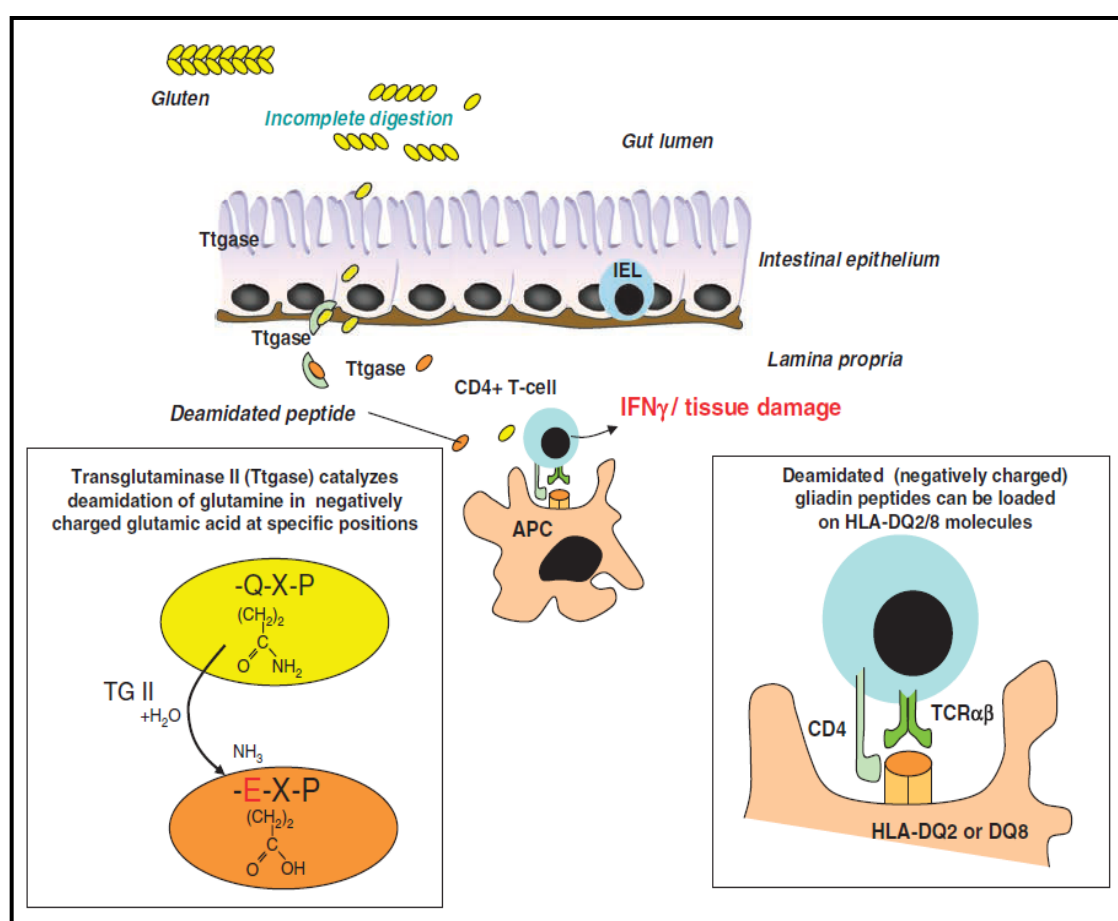


Figura 8. Un meccanismo chiave nella patogenesi della malattia celiaca (MC): risposta adattativa delle cellule T CD4⁺ della lamina propria al glutine orchestrata dalle molecole HLA-DQ2/8. Nella MC attiva, i peptidi del glutine lasciati indigeriti dagli enzimi luminali e dell'epitelio villare possono entrare nella mucosa intestinale. Grazie alla loro sequenza primaria ricca di motivi Q-X-P, i peptidi del glutine sono substrati preferenziali per la transglutaminasi tissutale II. Questo enzima è attivato da danni ai tessuti, e può deamidare i residui di glutammina neutra in acido glutammico a carica negativa (il riquadro a sinistra). Le cariche negative nei peptidi del glutine, così come la presenza di

residui di prolina in posizioni specifiche, facilitano il loro legame nella tasca del peptide HLA-DQ2/DQ8 espressa da cellule presentanti l'antigene (comprese probabilmente le cellule dendritiche CD11c⁺ e le cellule dendritiche plasmacitoidi CD123⁺ (Di Sabatino A. et al., 2007); riquadro a destra). La presentazione del glutine promuove l'attivazione di una risposta CD4⁺ Th1 gliadina-specifica nella lamina propria intestinale. L'IFN γ può partecipare all'induzione del danno mucosale.

L'introduzione post-traslazionale di cariche negative sui peptidi del glutine, mediante specifica deamidazione catalizzata dall'enzima tTG, incrementa l'interazione di tali peptidi con i residui carichi positivamente presenti nella tasca peptidica del HLA-DQ2/DQ8 (P4, P6 e P7 per DQ2; P1 e P9 per DQ8), generando così stabili complessi HLA efficientemente riconosciuti dalle cellule T (Molberg O. et al., 1998; Van de Wal Y. et al., 1998) (Figura 8).

Resta ancora in questione dove e quando la deamidazione del glutine avvenga. La tTG è essenzialmente attiva solo in presenza di livelli millimolari di Ca²⁺. Quando l'enzima è attivato, subisce un grosso cambio conformazionale in cui i residui C-terminali sono spostati di circa 120 Å (Pinkas D.M. et al., 2007) (Figura 9).

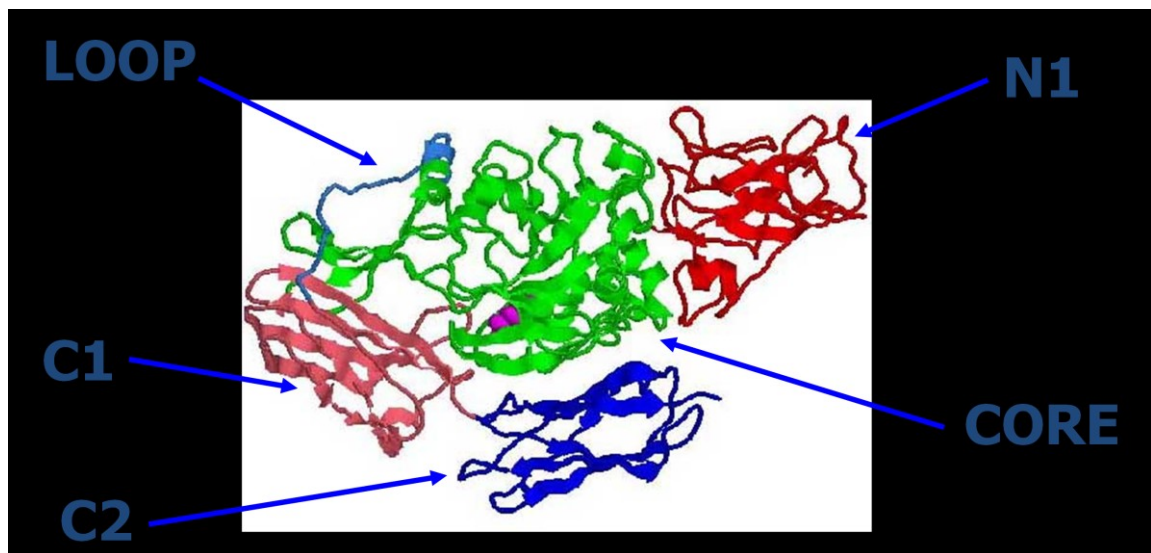


Figura 9. Struttura cristallografica della transglutaminasi tissutale II. C1/C2: estremità C-terminali; N1: estremità N-terminale.

La tTG è una proteina ubiquitaria trovata sia nel compartimento intracellulare, sia in quello extracellulare, sia in entrambi. La concentrazione intracellulare di Ca²⁺ è

bassa e strettamente controllata, invece quella dell'ambiente extracellulare è alta, così è stato assunto che la tTG extracellulare è enzimaticamente attiva. Tuttavia, un recente studio ha rivelato che la maggior parte della tTG extracellulare è inattiva, nonostante l'ambiente favorevole per l'attivazione enzimatica e che essa può essere enzimaticamente attivata da appropriati segnali lesivi (Siegel M. et al., 2008). Queste nuove indicazioni sulla biologia della tTG, suggeriscono che le modificazioni post-traslazionali dei peptidi del glutine, osservati nella malattia celiaca, possano verificarsi solo in presenza di esistenti danni tissutali, così come quelli causati dall'infezione o infiammazione negli stadi iniziali della malattia (Shuo-Wang Qiao L.I. et al., 2009). La tTG è espressa su molte superfici cellulari, in particolare sulla superficie dei monociti (Akimov S.S. et al., 2001) dove è complessata con le integrine legate alla membrana e alla matrice di fibronectina (Akimov S.S. et al., 2000). La presenza della tTG sulla superficie delle APC lascia pensare che questo complesso partecipi direttamente alla deamidazione dei peptidi del glutine, e probabilmente facilita anche l'accumulo di epitopi del glutine enzimaticamente complessati alla tTG, ma nessuna evidenza a supporto di tale ipotesi è stata ottenuta (Raki M. et al., 2007). Perciò al momento non si è stabilito se la tTG è presente sulla superficie delle cellule APC, e se così fosse, se questo complesso partecipa alla deamidazione dei peptidi del glutine, oppure aumenta l'accumulo degli antigeni del glutine.

1.4.2.2 Gli epitopi del glutine ristretti alle regioni DQ2/DQ8

Dall'identificazione, nel 1998, (Sjostrom H. et al., 1998) del primo epitopo della gliadina sulle cellule T ristretto alla regione DQ2, a oggi, sono stati trovati più di una dozzina di nuovi epitopi derivanti maggiormente dalle α e γ -gliadine del frumento (Arentz-Hansen H. et al., 2000; Vader W. et al., 2002), pochi dalla glutenina (Van de Wal Y. et al., 1999) e dall'avenina (Arentz-Hansen H. et al., 2004). La maggioranza di questi epitopi sono DQ2-ristretti, infatti, finora sono stati individuati solo tre epitopi del glutine DQ8-ristretti (Van de Wal Y. et al., 1999; Van de Wal Y. et al., 1998; Tollefsen S. et al., 2006). Gli epitopi delle cellule T gliadina-derivate tendono a raggrupparsi in regioni ricche di prolina

(Arentz-Hansen H. et al., 2002). Ci sono diverse ragioni per questo raggruppamento. In primo luogo, la prolina contribuisce alla resistenza proteolitica dei peptidi della gliadina, tale che i frammenti ricchi in prolina riescono a sopravvivere meglio all'ambiente proteolitico dell'intestino. In secondo luogo, la deamidazione tTG-mediata si traduce in un rafforzamento del legame con DQ2 o DQ8 perché il riconoscimento delle cellule T è altamente sequenza specifica. In questa situazione, è stato dimostrato che la disposizione dei residui di prolina nelle immediate vicinanze è il fattore più importante che determina se un residuo di glutammina è bersaglio della tTG o meno (Vader L.W. et al., 2002; Fleckenstein B. et al., 2002). Inoltre, si è riscontrato che alcuni epitopi della gliadina, in particolare quelli che più spesso sono riconosciuti dalle cellule T attivate dalle lesioni intestinali, che avvengono nella fase attiva della malattia, sono i migliori substrati per la tTG e sono deamidati più velocemente, rispetto agli epitopi meno noti (Dørum S. et al., 2009). Così, sembra che l'enzima tTG epitopo-modificante sia un elemento importante nella formazione del repertorio degli epitopi della gliadina sulle cellule T nella malattia celiaca. I residui di prolina sono insolitamente abbondanti negli epitopi della gliadina sulle cellule T, con ben quattro residui di prolina all'interno del nucleo di 9 mer della regione di legame (Tabella 1).

Alignment of the core region of DQ2-restricted and DQ8-restricted gluten epitopes.											
HLA restriction	Epitope	Peptide-binding register, P1-P9									Present in the 33mer
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
DQ2	avenin	P	Y	P	E	Q	E	E	P	F	
	gliadin- α -I	P	F	P	Q	P	E	L	P	Y	✓
	gliadin- α -III	P	Y	P	Q	P	E	L	P	Y	✓
	gliadin- α -II	P	Q	P	E	L	P	Y	P	Q	✓
	gliadin- γ -I	P	Q	Q	S	F	P	E	Q	<u>Q</u>	
	gliadin- γ -II	I	Q	P	E	Q	P	A	Q	L	
	gliadin- γ -VI	<u>Q</u>	Q	P	F	P	E	Q	P	<u>Q</u>	
	gliadin- γ -IV	S	Q	P	E	Q	E	F	P	Q	
	gliadin- γ -VII	P	Q	P	E	Q	E	F	P	Q	
	gliadin- γ -III	<u>Q</u>	Q	P	E	Q	P	Y	P	<u>Q</u>	
	gliadin- γ -VII	<u>Q</u>	Q	P	E	Q	P	F	P	<u>Q</u>	
	gliadin- α -20	F	R	P	E	Q	P	Y	P	Q	
	glutenin-17	P	F	S	E	Q	E	Q	P	V	
DQ8	gliadin- γ -I	E	Q	P	<u>Q</u>	Q	P	F	P	Q	
	gliadin- γ -I	E	Q	P	<u>Q</u>	Q	P	Y	P	E	
	gliadin- α -I	E	G	S	F	Q	P	S	Q	E	
	glutenin	E	G	Y	Y	P	T	S	P	E	

Tabella 1. I residui di glutammato formati dalla deamidazione tTG-mediata, importanti per il riconoscimento da parte delle cellule T DQ2/DQ8-ristrette sono mostrati in grassetto. Inoltre, i residui di glutammina, anche bersaglio della tTG sono sottolineati.

Poiché la prolina è un amminoacido che non può partecipare alla formazione di legami idrogeno essenziali per la struttura peptidica, i peptidi ricchi in prolina non sono particolarmente adatti per il legame alle molecole MHC di classe II. DQ2 sarebbe un'eccezione, giacché riconosce facilmente la prolina in determinate posizioni, in particolare nel P1, P3, P5 e P8, dove la posizione della prolina non è penalizzata dalla perdita dei legami idrogeno tra la struttura peptidica e i residui MHC conservati, come dimostrato dalla struttura cristallografica del DQ2 legato con il peptide della α 1-gliadina (Qiao S.W. et al., 2005) (Figura 10).

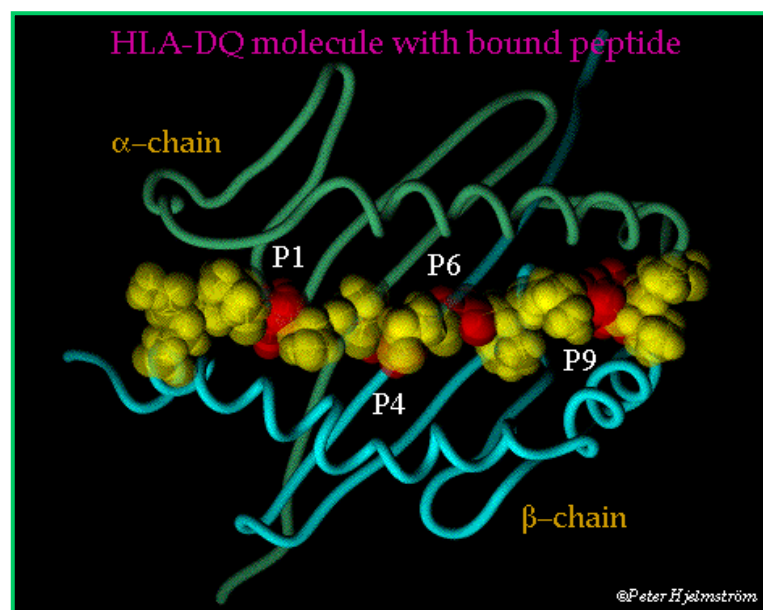


Figura 10. Struttura cristallografica del HLA-DQ2 legato al peptide della α 1-gliadina.

A causa di un'unica delezione Arg53 α , il DQ2 è l'unica molecola DQ nota per accettare la prolina al P1 (Tollefsen S. et al., 2006; Stepniak D. et al., 2008). Quasi la metà degli epitopi della gliadina DQ2-ristretti sulle cellule T, e tutti gli epitopi della α -gliadina DQ2-ristretti contenuti all'interno del peptide immunodominante di 33 mer, hanno la prolina in P1. Un recente studio di legame ha confermato che il DQ2 è la molecola di classe II preferita da parte dei peptidi della gliadina contenenti gli epitopi sulle cellule T celiache (Bergseng E. et al., 2008). In confronto, la minore suscettibilità dell'allele HLA-DQ8, accetta meno bene peptidi

ricchi in prolina, in particolare per la sua incapacità di legare la prolina in P1 (Tollefsen S. et al., 2006; Henderson K.N. et al., 2007) (Figura 11).

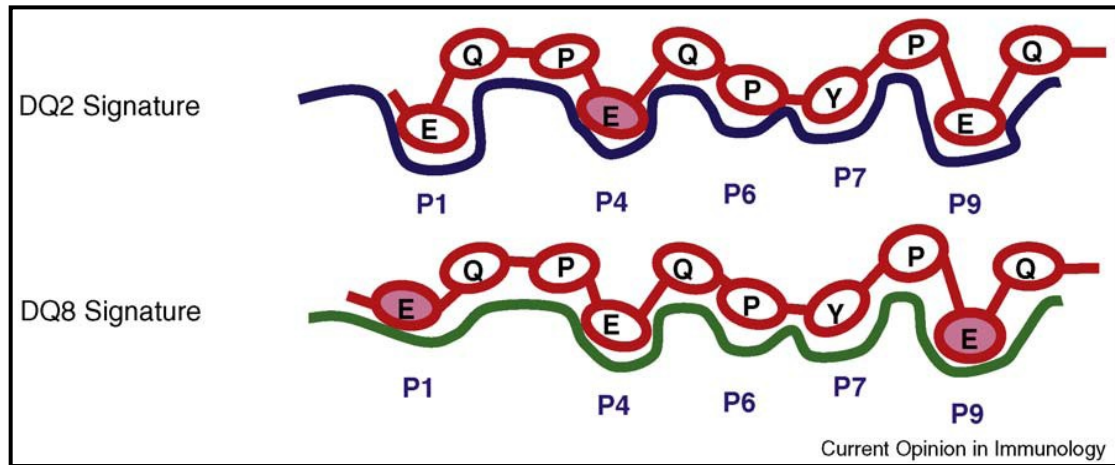


Figura 11. Peptide legante i domini delle molecole DQ2 e DQ8. L'epitopo DQ2-ristretto γ -III e DQ8-ristretto γ -I, riconosciuti dalle cellule T-lesioni derivate dei pazienti celiaci, condividono la stessa sequenza core di 9 amminoacidi. Questa sequenza contiene tre residui di glutammato formati dalla deamidazione tTG-mediata nelle posizioni P1, P4 e P9. DQ2 preferisce i residui del glutammato carichi negativamente in P4 (in rosa) mentre DQ8 preferisce il glutammato in P1 e P9 (in rosa).

Così, DQ8 non può presentare la maggior parte degli epitopi immunodominanti DQ2-ristretti della α -gliadina e solo l'epitopo identificato della α -gliadina DQ8-ristretto non si trova nelle regioni ricche di prolina, proteoliticamente resistenti, delle proteine della α -gliadina. Grazie alla sua speciale capacità di accogliere peptidi ricchi di prolina e alla sua preferenza per il glutammato carico negativamente, la molecola DQ2 è particolarmente indicata per legare frammenti di gliadina ricchi di prolina e glutammato prodotti dalla digestione luminale e dalla deamidazione della tTG. DQ8 condivide alcune di queste caratteristiche di legame, ma è complessivamente meno adatto per il legame e la presentazione dei peptidi della gliadina, perciò questo allele conferisce meno rischi di insorgenza della malattia in relazione al DQ2 (Shuo-Wang Qiao L.I. et al., 2009). Questo meccanismo di riconoscimento dipendente dalla deamidazione operata dalla tTG esemplifica, dunque, l'importanza delle modificazioni post-traslazionali delle

proteine nella creazione di nuovi epitopi sulle cellule T (Michaelsson E. et al., 1994; Skipper J.C. et al., 1996).

1.4.3 Meccanismo d'immunità adattativa al glutine

È stato dimostrato che le linee cellulari T CD4⁺ glutine-specifiche e i cloni derivati da pazienti celiaci producono interferone, in particolare come risposta alle cellule dendritiche attivate, isolate dalla mucosa celiaca attiva (Raki M. et al., 2006). In accordo con la risposta Th1 gliadina-guidata, l'IFN γ si trova in grande eccesso nella mucosa intestinale celiaca attiva (Nilsen E. et al., 1995) e può quindi causare gravi danni mucosali (Guy-Grand D. et al., 1998) (Figura 8). Questi risultati stabiliscono il ruolo centrale dell'immunità adattativa nella malattia celiaca all'interfaccia tra i due principali fattori ambientali e genetici. La sua importanza è ulteriormente rilevata dall'evidenza di un effetto dose del gene HLA-DQ2. Pertanto, il rischio dello sviluppo della celiachia è cinque volte superiore in individui HLA-DQ2 omozigoti rispetto agli eterozigoti. Negli individui omozigoti, quest'osservazione è stata correlata con la capacità delle APC di causare più forti risposte delle cellule T glutine-specifiche rispetto alle APC di soggetti eterozigoti, una proprietà attribuita alla maggiore densità delle molecole HLA-DQ2 sulla loro superficie (Vader W. et al., 2003).

1.4.4 Meccanismo d'immunità innata al glutine

Oltre alla risposta immunitaria adattativa al glutine, le proteine dal frumento, segale e orzo (apparentemente in contrapposizione alle proteine dei cereali “non tossici” derivate, per esempio, da mais o riso) possono provocare anche una risposta immunitaria innata nelle cellule presentanti l'antigene (monociti, macrofagi e cellule dendritiche) che attiva prevalentemente i linfociti intraepiteliali (IEL) ma anche le cellule epiteliali intestinali (Cinova J. et al., 2007; Thomas K.E. et al., 2006). Questa risposta immunitaria innata è una reazione immediata ed è di solito diretta, in maniera pressoché uniforme, contro gli antigeni microbici, ma anche contro costituenti ancora non ben definiti dei cereali (Meresse B. et al., 2009; Palmer E., 2007). Nella malattia celiaca, la risposta immunitaria innata sembra favorire lo sviluppo d'immunità adattativa al glutine in pazienti che presentano

l'allele HLA-DQ2 o DQ8 (Maiuri L. et al., 2003). Il peptide P31-43 della α 2-gliadina, che è distinto dai peptidi che suscitano l'immunità adattativa, ha dimostrato di innescare l'immunità innata negli epitelii intestinali e nelle colture d'organo intestinale (Maiuri L. et al., 2003; Londei M. et al., 2005). Altri peptidi, come riportato, stimolano i monociti dei roditori o il rilascio di citochine macrofagiche (Cinova J. et al., 2007; Palova-Jelinkova L. et al., 2005; Tuckova L. et al., 2002). Tuttavia, questi peptidi non sono stati ufficialmente confermati e nessuno degli studi fatti ha identificato un recettore in cellule di un sottoinsieme cellulare responsivo. Due recenti studi, che rigorosamente escludono la contaminazione da lipopolisaccaridi, indicano MyD88, come il principale trasduttore di segnale a valle del recettore Toll-like 4 su monociti, macrofagi e cellule dendritiche, e il recettore Toll-like 4 (in se) come recettore primario per le risposte innate alle proteine dei cereali (Thomas K.E. et al., 2006; Junker Y. et al., 2009).

1.4.5 Il ruolo dei linfociti intraepiteliali

Sono stati compiuti molti progressi nella comprensione di come gli IEL sono attivati da proteine dei cereali luminari. I sistemi perforina/granzima e/o Fas/FasL sono al centro della citotossicità osservata e dell'attività degli IEL che inducono l'apoptosi sull'epitelio intestinale nella malattia celiaca (Ciccocioppo R. et al., 2000; Salvati V.M. et al., 2005). L'attivazione immune innata degli IEL provocata dal glutine induce l'espressione, sull'epitelio intestinale, di MICA (MHC class I chain-related genes), una molecola che rappresenta una classe di geni HLA insolita, la quale funge da ligando per il recettore eterodimerico NKG2D presente sulle cellule T $\gamma\delta$ "natural killer"(NK) e su sottoinsiemi di cellule T CD4⁺ e CD8⁺ (Burgess S.J. et al., 2008). MICA, a livello epiteliale, e la sovraregolata produzione epiteliale di interleuchina (IL)-15 portano all'attivazione di NKG2D sugli IEL (Hue S. et al., 2004). Anche NKG2D congiunge l'immunità innata e quella adattativa, perché tale recettore innesci la citotossicità antigene-specifica mediata dai linfociti e induce una diretta funzione citolitica, indipendente dalla specificità del recettore delle cellule T (TCR), nelle cellule T CD8 effettrici (Meresse B. et al., 2004). Analogamente, il recettore NKG2C, che si attiva con il suo ligando epiteliale HLA-E, è implicato nella patogenesi della malattia celiaca, stimolando la

proliferazione degli IEL e la secrezione di citochine in pazienti affetti dalla malattia (Terrazzano G. et al., 2007; Jabri B. et al., 2000; Meresse B. et al., 2006). Gli IEL possono avere anche una capacità immunomodulante attraverso la secrezione del fattore di crescita trasformante (TGF)- β 1, come riportato per un sottoinsieme di IEL CD8⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺ che esprimono il recettore NKG2A inibitore delle cellule T “natural killer”. È interessante notare che questo sottogruppo di cellule è stato ritrovato in campioni biotici duodenali di pazienti affetti da malattia celiaca attiva rispetto a controlli o pazienti che seguono una dieta priva di glutine (Bhagat G. et al., 2008). Il ruolo centrale dell’IL-15 nell’attivazione dell’immunità innata e adattativa nella malattia celiaca è stato confermato da diversi ricercatori, (Di Sabatino A. et al., 2006; Benahmed M. et al., 2007; Bernardo D. et al., 2008; Maiuri L. et al., 2000; Mention J.J. et al., 2003) accoppiato anche con un aumento dell’espressione del recettore dell’IL-15 e una soglia più bassa per l’attivazione sugli IEL (Bernardo D. et al., 2008). Sia gli epitelii intestinali sia le cellule dendritiche/macrofagi sono le principali fonti di IL-15 (Di Sabatino A. et al., 2006; Maiuri L. et al., 2001). Recentemente, l’IL-21, che è prodotta dalle cellule T Th1 CD4⁺, è emersa come una forza supplementare nella guida dell’immunità innata che agisce spesso in concomitanza con l’IL-15 (Meresse B. et al., 2008).

Un modello, ora in fase di sviluppo, spiega come le cellule che sono state in precedenza attivate da un fenotipo Th1 da citochine come l’IFN α , sono in grado di produrre IL-21, che interagisce con altre cellule T CD4⁺ generando più IFN γ nella lamina propria, e forse in maniera ancora più importante, è in grado di interagire con IL-15, che stimola la produzione di IFN γ in cellule dell’epitelio con conseguente rimodellamento caratteristico dei villi intestinali, tipico della malattia celiaca (Ebert E.C. et al., 2005). La natura esatta dell’interazione dell’IL-15/IL-21 è sconosciuta e, a questo punto è possibile solo formulare ipotesi sulla base delle funzioni delle citochine in altri tessuti. Forse la domanda più interessante da formulare potrebbe essere: come interagiscono e in particolare come influenzano la risposta degli individui sensibili ai peptidi della gliadina, NKG2D, IL-15 e IL-21?. Le Figure 12 e 13 riassumono i concetti chiave della patogenesi della malattia celiaca.

1.4.6 Cellule T regolatorie

Le cellule T regolatorie CD4⁺ (Tregs) possono sottoregolare la risposta distruttiva delle cellule T, sia nell'autoimmunità sia nelle infezioni. Anche se il loro ruolo in modelli murini di autoimmunità e nelle malattie infiammatorie croniche intestinali è ben consolidato, (Izcue A. et al., 2009) la loro rilevanza come soppressori di cellule T umane malattia-mediate è da poco formulata. Le Tregs CD4⁺, CD25⁺, Foxp3⁺ sono state ritrovate in cellule mononucleari del sangue periferico e in campioni biotici intestinali di pazienti con celiachia, ma gli studi funzionali non sono ancora stati condotti (Frisullo G. et al., 2009; Gianfrani C. et al., 2006). In modelli murini, queste cellule sono generate in periferia (prevalentemente nei linfonodi mesenterici) e in misura minore a livello intestinale (placche di Peyer e lamina propria) da cellule T CD4⁺ in presenza di TGF-β1 e acido retinoico (Mucida D. et al., 2009). Questa maturazione avviene in presenza delle cellule dendritiche (producenti acido retinoico) che presentano l'antigene bersaglio, seguita dalla venuta delle Tregs soprattutto nell'intestino, dove esse sottoregolano le risposte immunitarie. È interessante notare che quando l'acido retinoico è sostituito dall'IL-6, le cellule T sono convertite in cellule Th17 distruttive (Mucida D. et al., 2007; 2009). Le Tregs CD8⁺ solo di recente sono tornate alla ribalta come importanti soppressori della risposta immunitaria intestinale, fatto principalmente dovuto a una migliore comprensione dei meccanismi coinvolti (Smith T.R. et al., 2008; Van Wijk F. & Cheroutre H., 2009). Come le cellule T citotossiche CD8⁺ che sono coinvolte nella distruzione delle mucose, sia nelle malattie intestinali infiammatorie sia nella malattia celiaca, le Tregs CD8⁺, come gli IEL risiedono principalmente nel comparto epiteliale dell'intestino. In modelli murini di malattie intestinali infiammatorie croniche, gli IEL citotossici CD8⁺ sembrano avviare e mantenere la distruttiva risposta immunitaria T CD4⁺ cellulo-mediata all'interno della lamina propria, con conseguente invasione della barriera mucosale, ingresso di antigeni del lume, e stimolazione massiccia di una risposta delle cellule T CD4⁺ Th1 (Cheroutre H., 2006; Nancey S. et al., 2006; Westendorf A.M. et al., 2006).

1.4.7 Citochine e rimodellamento della matrice nella malattia celiaca

Cloni di cellule T gliadina-specifiche e HLA di classe II-ristrette esprimono l'IFN γ . Un anticorpo bloccante l'IFN γ può evitare il danno istologico della mucosa intestinale sana in colture d'organo intestinali esposte a surnatanti di cloni di cellule T gliadina-specifiche di pazienti affetti da malattia celiachia (Przemioslo R.T. et al., 1995), considerando che l'IL-10 da Tregs elimina le cellule Th1 e agisce come un probabile controregolatore delle citochine (Forsberg G. et al., 2002). Le citochine sono importanti forze trainanti nel rimodellamento tissutale che porta all'atrofia dei villi e all'iperplasia delle cripte, caratteristiche della malattia celiaca. In colture intestinali di espianti fetali umani, l'IFN γ attiva i macrofagi che a loro volta secernono il fattore di necrosi tumorale α (TNF α) e metalloproteinasi proteolitiche della matrice (MMP), come la MMP-12 e la MMP-13. Nei miofibroblasti intestinali, sia il TNF α sia l'IFN γ stimolano l'espressione di MMP-1 e MMP-3. Questo rilascio composito di MMP e la loro attivazione inducono la proteolisi della matrice extracellulare, una preconditione per il rifacimento architettónico osservato nelle malattie infiammatorie intestinali e nella malattia celiaca (Pender S.L. et al., 1997; Daum S. et al., 1999; Ciccocioppo R. et al., 2005).

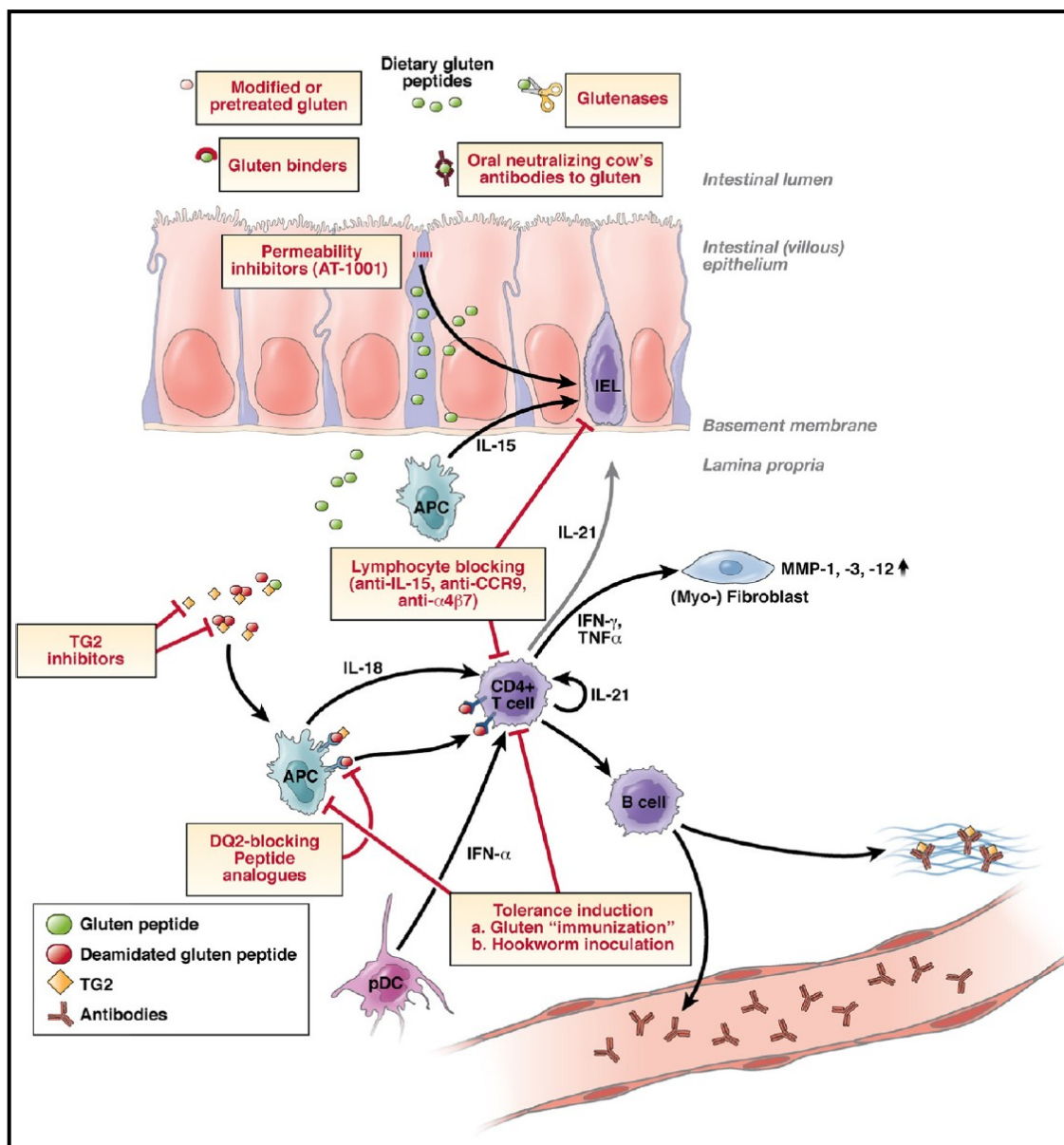


Figura 12. Patogenesi della malattia celiaca. I peptidi del glutine che sono molto resistenti alle proteasi intestinali raggiungono la lamina propria, sia tramite transitosi epiteliale sia tramite aumento della permeabilità epiteliale delle giunzioni strette. I legami crociati e in particolare la deamidazione dei peptidi del glutine da parte della tTG creano potenti epitopi immunostimolanti che vengono presentati attraverso HLA-DQ2 o HLA-DQ8 sulle cellule presentanti l'antigene. In seguito, le cellule T CD4⁺ sono attivate, secernendo principalmente citochine Th1, quali IFN γ , che induce il rilascio e l'attivazione di MMP da miofibroblasti, infine risultanti nel rimodellamento della mucosa e nell'atrofia dei villi. Inoltre, le citochine Th2 sono prodotte per guidare la produzione di autoanticorpi contro il glutine e della tTG. Altre citochine quali IL-18, IFN α , o IL-21 sembrano svolgere un ruolo nella polarizzazione e nel mantenimento della risposta Th1. Inoltre, l'IL-15 collega il sistema immunitario adattativo alle risposte immunitarie innate (vedi Figura 13). In questa schematizzazione il sistema è semplificato. Esso non dimostra che le cellule T diffondono nei

1.5 Patologia

La sprue celiaca colpisce la mucosa dell'intestino tenue prossimale con un danno gradualmente decrescente in severità nei confronti dell'intestino tenue distale, anche se in casi più gravi, la lesione si estende all'ileo. Il grado del danno prossimale varia notevolmente secondo la gravità della malattia. Esso può essere molto lieve nei casi "silenti" con poche o nessuna anomalia rilevabile istologicamente nel digiuno medio. Anomalie della mucosa gastrica e rettale possono essere osservate solo in alcuni casi (Kiln G. et al., 1980). Per esaminare i campioni biotici della mucosa intestinale può essere utile utilizzare un microscopio a dissezione. Questo consente agli osservatori di distinguere tra mucose con villi normali e campioni biotici con villi appiattiti che sono presenti nella sprue celiaca con gradi vari di anomalia. La mucosa sana presenta villi digitiformi e creste. I villi variano in dimensioni, forma e altezza, ma di solito sono tre volte più alti di quanto sono ampi (Figura 14 A). Le circonvoluzioni normali, sono lunghe creste che possono essere considerate come villi che si sono fusi e affibbiati tra loro. La mucosa dell'intestino tenue nella sprue celiaca, per contro, può essere piatta e senza una forma e può presentare un modello mucosale piatto causato dall'interazione di profonde depressioni che lasciano elevati cumuli cellulari. Ogni cumulo ha 40-80 aperture a cripta. L'aspetto istologico caratteristico della mucosa intestinale di un paziente celiaco non trattato classicamente presenta una mucosa piatta con riduzione del rapporto tra altezza dei villi normali e profondità delle cripte da 5:1 a 3:1 (Figura 14 B), tanto da portare alla completa atrofia villare (Ciclitira P.J., 2001).

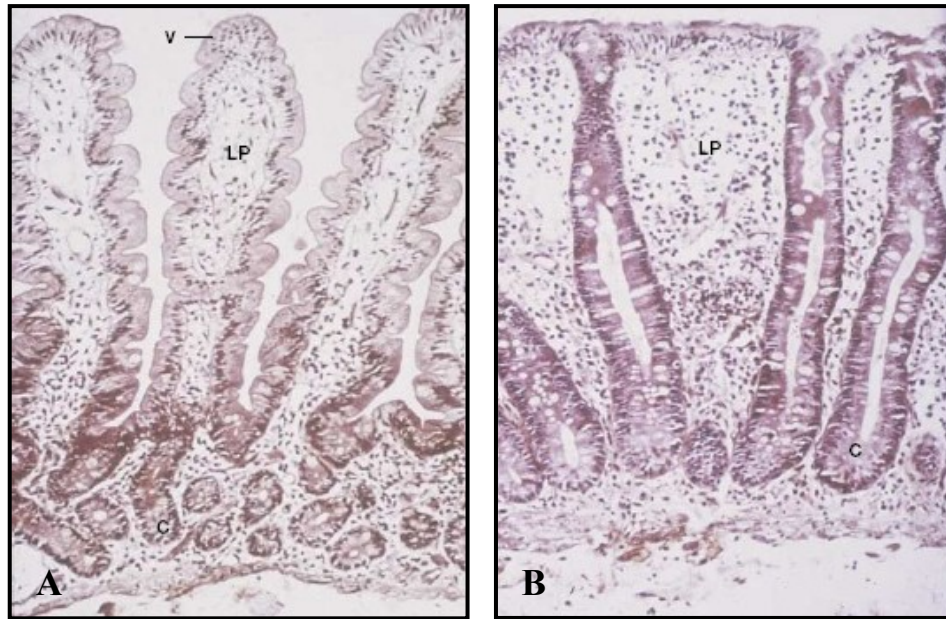


Figura 14. Preparazione istologica di un campione di una biopsia intestinale da:
(A) un soggetto sano e (B) un soggetto con sprue celiaca non trattata. V: villi; LP:
lamina propria; C: cripte.

Lo spessore totale della mucosa può aumentare a causa dell'iperplasia delle cripte e delle infiltrazioni della lamina propria da parte di plasmacellule e linfociti. La superficie dell'epitelio, invece è ridotta, e spesso gli enterociti appaiono cuboidali e basofili con il citoplasma ricco di vacuoli. L'attività mitotica delle cripte è di norma limitata al terzo inferiore delle stesse, ma nella sprue celiaca quest'attività può essere aumentata, sebbene l'aspetto istologico della cripta sembri essere normale. Vi è inoltre, una generalizzata infiltrazione linfocitaria dell'epitelio che può estendersi anche nelle cripte. Il tempo necessario alle cellule per migrare dalle cripte alla superficie è ridotto da 3-5 giorni a 1-2 giorni. Il numero di linfociti intraepiteliali in relazione al numero di enterociti di superficie aumenta nei pazienti con la malattia attiva. Le cellule infiammatorie croniche s'infiltrano nella mucosa intestinale nei casi di celiachia non trattata. C'è inoltre, un aumento di plasmacellule nella lamina propria e di linfociti nell'epitelio di superficie. La maggior parte degli IEL esprime l'antigene leucocitario comune CD3, il 70% esprime il fenotipo soppressore/citotossico CD8, il 5%-10% esprime il fenotipo helper/induttore CD4, e il 20% delle cellule sono CD3⁺, CD4⁻ e CD8⁻. C'è anche un aumento del numero

di IEL che esprimono il più primitivo recettore delle cellule T γ/δ nella condizione non trattata (Ciclitira P.J., 2001).

1.5.1 Tipi di lesioni della mucosa

Una classificazione delle lesioni mucosali è stata fornita per la prima volta da Marsh, il quale descrisse la progressione delle anomalie della mucosa intestinale come risposta al glutine. Le lesioni della mucosa intestinale sono state raggruppate in cinque tipologie diverse (Marsh M.N., 1992).

Tipo 0 -Lesione preinfiltrativa. Il 5% dei pazienti con dermatite herpetiforme (DH) presenta piccoli campioni di biopsia intestinale che sembrano normali, ma contengono anticorpi anti-gliadina.

Tipo 1 -Lesione infiltrativa. Vi è un'architettura della mucosa normale, ma con un maggior numero di IEL. Questa lesione avviene nel 40% dei pazienti con DH e il 10% di parenti di primo grado di pazienti affetti da celiachia (Marsh M.N., 1992). Questa lesione non è associata a sintomi o segni di malassorbimento o alterata permeabilità intestinale.

Tipo 2 -Lesione iperplastica. In aggiunta agli IEL aumentati, vi è un aumento nella profondità delle cripte senza una riduzione in altezza dei villi. Il carico di glutine può indurre questi cambiamenti, che si vedono nel 20% dei pazienti con DH non trattati e nei pazienti celiaci.

Tipo 3 -Lesione distruttiva. È la classica lesione celiaca. Si trova nel 40% dei pazienti con DH e nel 10%-20% dei parenti di primo grado di pazienti celiaci e, nonostante i marcati cambiamenti della mucosa, molti individui sono asintomatici e per questo la malattia viene classificata come subclinica. Questa lesione è caratteristica, ma non diagnostica per la sprue celiaca, in quanto, può presentare casi di: giardiasi grave, intolleranze alimentari infantili, ischemia cronica del piccolo intestino, sprue tropicale, carenza di Ig e altre carenze immunitarie e rigetto da trapianto.

Tipo 4 -Lesione ipoplasica. Può essere considerata la lesione di stadio finale in un gruppo molto piccolo di pazienti che non rispondono alla mancata assunzione di glutine e possono sviluppare complicazioni maligne. Vi è deposizione di collagene nella mucosa e nella sottomucosa (sprue collagenosa), che di solito non è

responsiva al trattamento con steroidi, agenti immunosoppressori o chemioterapici (Ciclitira P.J., 2001).

1.6 Presentazione clinica: segni e sintomi

La presentazione clinica della malattia celiaca avviene dopo lo svezzamento e l'introduzione dei cereali nella dieta di un individuo. Essa varia notevolmente, secondo l'età del paziente, la durata e l'estensione della malattia, la presenza di manifestazioni extraintestinali (Chand N. et al., 2006). La celiachia colpisce in primo luogo l'intestino tenue prossimale, ma in alcuni individui lo può coinvolgere anche interamente. Questa collocazione prossimale della malattia si traduce spesso in palese malassorbimento di vitamine (B12, D) e minerali (Ca^{2+} , Fe^{3+}). La diarrea nella presentazione della malattia è dovuta alla progressione della malattia nell'intestino tenue distale (Green P.H. & Jabri B., 2003). I sintomi classici associati alla sprue celiaca nei bambini sono diarrea, distensione addominale, e arresto della crescita (Green P.H. & Jabri B., 2003). Allo stesso modo, gli adolescenti e gli adulti presentano diarrea, costipazione, perdita di peso, debolezza, bassa statura, dolore addominale e vomito (Green P.H.R. et al., 2001, 2005; Fasano A., 2005). Anche la presenza dell'obesità non esclude la diagnosi di celiachia (NIH Consensus Development Conference on Celiac Disease, 2005; Murray J.A. et al., 2003). Manifestazioni cliniche atipiche a livello gastrointestinale (GI) sono caratterizzate da pochi o nessun sintomo, invece, predominano i sintomi extraintestinali quali anemia da carenza di ferro, ridotta densità minerale ossea, stanchezza cronica, colon irritabile, dispepsia, infertilità, aborto spontaneo, ipertransaminemia, coagulopatia, bassa statura, ritardo puberale, artralgia, stomatite aftosa, carenza di zinco/folato, ipoplasia dello smalto dentale, e altri inspiegabili disturbi neurologici (soprattutto neuropatia periferica e atassia) (Dewar D.H. et al., 2005; Fasano A. & Catassi C., 2001; Green P.H. et al., 2005; Fasano A., 2005; NIH Consensus Development Conference on Celiac Disease, 2005; Leffler D. et al., 2003). I pazienti che hanno una forma subclinica di malattia celiaca non sono a conoscenza di averla, perché apparentemente non hanno sintomi fisici, tuttavia sono positivi al test sierologico per la malattia e presentano atrofia dei villi nelle biopsie intestinali (NIH Consensus Development Conference on Celiac Disease, 2005). La malattia celiaca subclinica è identificata dallo screening dei gruppi a rischio o dal

riconoscimento di biopsie fatte per altra motivazione (ad esempio, dispepsia o reflusso) (Green P.H. et al., 2000; Bardella M.T. et al., 2000). I gruppi a rischio includono i parenti di primo grado dei pazienti celiaci (Fasano A. et al., 2003; Jones R.B. et al., 2006); persone con la sindrome di Down (Mackey J. et al., 2001), e quelli con una malattia autoimmune, come il diabete di tipo 1 (Jones R.B. et al., 2006; Talal A.H. et al., 1997) e la tiroidite di Hashimoto (Counsell C.E. et al., 1994; Collin P. et al., 2002). Le patologie autoimmuni si verificano 3-10 volte più frequentemente negli individui con malattia celiaca che nella popolazione generale (Viljamaa M. et al., 2005; Sategna Guidetti C. et al., 2001; Ventura A. et al., 1999). Inoltre, esistono prove che il rischio di sviluppare altre patologie autoimmuni aumenta con la durata dell'esposizione al glutine (Ventura A. et al., 1999). Condizioni associate a un aumento di prevalenza della celiachia sono: artrite reumatoide (Hull R., 1989), Lupus Eritematoso Sistemico (Rensch M.J. et al., 2001), malattie del fegato autoimmuni (Kaukinen K. et al., 2002; Volta U. et al., 2002), sindrome di Turner (NIH Consensus Development Conference on Celiac Disease, 2005), sindrome di Williams, malattia di Addison (O'Leary C. et al., 2002), alopecia areata, sindrome di Sjögren (Collin P. et al., 2002), cirrosi biliare primaria, epatite autoimmune, neuropatia periferica, psoriasi e cardiomiopatia (Volta U. et al., 2002; American Gastroenterological Association). Anche l'aumento dell'incidenza di neoplasie dell'intestino tenue, dell'adenocarcinoma, e dell'enteropatia associata al linfoma a cellule T è stata riportata nella malattia celiaca non trattata (Green P.H.R. et al., 2001; Card T.R. et al., 2004). Una presentazione unica di celiachia è la dermatite herpetiforme, una manifestazione rara della pelle che colpisce circa il 10%-20% dei pazienti celiaci (Reunala T., 1998; Fry L. et al., 2002). Anche se i pazienti con DH non rischiano di avere sintomi gastrointestinali o le caratteristiche del malassorbimento (Ciclitira P.J. et al., 2005), i profili anticorpali sierologici sono simili e il danno infiammatorio della mucosa del piccolo intestino è identico a quello visto nella malattia celiaca (Ciclitira P.J. et al., 2005).

1.6.1 Categorie di sprue celiaca

La crescente consapevolezza della base genetica della celiaca, le associazioni con altre malattie, e i cambiamenti nei modelli di presentazione della patologia

spiegano lo sviluppo di nuove tecniche di “screening”, che hanno rilevato un gran numero d’individui che non possono essere classificati semplicemente per la presenza o assenza della malattia. Studi di “screening” di popolazione su grande scala indicano che la popolazione celiaca diagnosticata può rappresentare la punta di un iceberg di casi non diagnosticati (Fasano A. & Catassi C., 2001) (Figura 15).

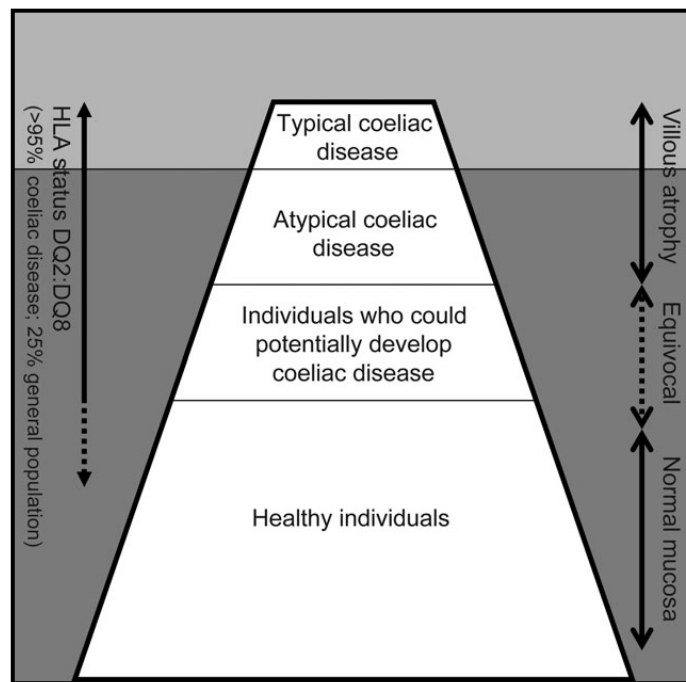


Figura 15. “L’iceberg celiaco”.

Questo concetto dimostra la variabilità clinica della celiachia e aiuta a capire la sua natura sistemica. Il più alto strato dell’iceberg (sopra la superficie del mare) descrive i pazienti con i tipici sintomi gastrointestinali. Questi pazienti sono di solito in cerca di cure sanitarie e presentano tutti i sintomi gastrointestinali, pertanto la diagnosi può essere fatta. Lo strato successivo (appena sotto il livello dell’acqua) raccoglie quei pazienti che hanno presentazioni atipiche della malattia celiaca. Gli individui di questo gruppo, infatti, mostrano le tipiche modificazioni morfologiche della mucosa intestinale ma assenza di segni clinici e sintomi gastrointestinali. Se è interessato solo l’intestino tenue prossimale, ci può essere una compensazione fisiologica da parte del tenue sano, anche se è probabile che i sintomi si possano manifestare nel momento in cui il carico di glutine è aumentato. Ecco perché tale forma di celiachia è chiamata anche silente. La celiachia latente, invece raggruppa

tutte le persone che hanno suscettibilità genetica alla malattia, ma non manifestano evidenze cliniche o istologiche. E' probabile che i tempi e la qualità del carico di glutine, forse in combinazione con altri fattori ambientali o malattie concomitanti, possano rappresentare un fattore scatenante la malattia, per questi individui. La forma di celiachia latente descrive due gruppi di pazienti. Coloro che hanno avuto fino ad un certo punto della vita una normale biopsia duodenale, facendo una dieta regolare e in seguito sviluppano l'atrofia dei villi intestinali, con le modifiche istologiche caratteristiche. Oppure, al contrario, i pazienti pur avendo caratteristiche istologiche di atrofia villare, continuano una dieta contenente glutine e alla re-biopsia due anni più tardi, presentano una normale mucosa duodenale (John S. Leeds et al., 2008). C'è da dire però, che il fenomeno della celiachia latente è raro ed è stato descritto solo in casi particolari. Dal punto di vista clinico, è accettato che i pazienti con la malattia celiaca, continueranno ad avere evidenze istologiche di danno all'intestino tenue, salvo che il glutine non è ritirato dalla loro dieta. Il quarto strato dell'iceberg descrive, invece, tutti gli individui con test sierologici positivi, ma normale istologia nella biopsia duodenale. Questa circostanza può verificarsi in parenti di primo grado di pazienti con malattia celiaca (Fasano A. et al., 2003), così come in chi soffre di malattie autoimmuni come l'ipotiroidismo (Sategna Guidetti C. et al., 2001; Hakanen M. et al., 2001), il diabete di tipo 1 (De Vitis I. et al., 1996; Sjöberg K. et al., 1998) e la malattia di Addison (O'Leary C. et al., 2002). Queste condizioni è stato dimostrato che condividono polimorfismi simili del HLA di classe II sul cromosoma 6, in particolare nei loci DR3 e DR4 (Dewar D. et al., 2004). Inoltre, a questa classe appartengono anche i cosiddetti "veri normali", cioè quegli individui che mancano di suscettibilità genetica per tale condizione e non manifestano né caratteristiche istologiche tipiche né sintomi clinici, in ogni fase della loro vita. Tuttavia, vi è una condizione separata in cui vi è un'allergia al glutine o ad altre proteine del grano che porta alla produzione di IgE. Coloro invece, che si trovano in una condizione non diagnosticata rientrano nella categoria a parte di sprue celiaca non diagnosticata. Questi individui presentano le lesioni tipiche della mucosa e sono sintomatici, ma non è stata ancora diagnosticata la malattia (Ciclitira P.J. 2001).

1.7 Diagnosi

Oggi la celiachia è considerata un problema sociale tanto che è stata varata la legge n.123 del 4 luglio 2005 in cui sono codificate le norme per la protezione dei soggetti malati di celiachia. In breve, la legge prevede l'attuazione di provvedimenti mirati a compiere precocemente la diagnosi della malattia, a migliorare i modi di cura dei cittadini celiaci, a migliorare l'educazione sanitaria della popolazione sulla malattia celiaca, a favorire l'educazione sanitaria del cittadino celiaco e della sua famiglia e a compiere la diagnosi precoce e la prevenzione delle complicanze della malattia stessa.

1.7.1 La biopsia intestinale

Come dimostrato dall'iceberg celiaco, la presenza di sintomi rilevanti non è sufficiente per diagnosticare la malattia celiaca. Inoltre, fino a oggi, non esiste nessun singolo test che possa definitivamente diagnosticare o escludere la malattia (NIH Consensus Development Conference on Celiac Disease, 2005). I test sierologici, usati come "screening" iniziali non invasivi, rappresentano il primo passo nell'avanzamento di una diagnosi di malattia celiaca. Infatti, la diagnosi definitiva può essere ottenuta solo attraverso l'esame istopatologico della mucosa digiunale, nonché la biopsia dell'intestino tenue, volta a rilevare l'atrofia dei villi. L'analisi biptica è indicata per ogni persona con una storia clinica che suggerisce la presenza della patologia, inclusi gli individui con sintomi lievi, in particolare se sono parenti dei probabili pazienti affetti. Anche chi presenta DH, è soggetto alla biopsia, e questo non solo per confermare la presenza di una concomitante enteropatia glutine-sensibile, ma anche per determinare la gravità dell'enteropatia. Si è soliti prelevare biopsie per via endoscopica e in particolare dalla seconda parte del duodeno. Per arrivare a una diagnosi di certezza sono necessarie tre biopsie effettuate in tre momenti diversi: la prima biopsia al momento della comparsa dei primi sintomi, la seconda 6-12 mesi dopo l'inizio di una dieta priva di glutine che deve evidenziare la scomparsa delle lesioni istologiche, e la terza da 1 a 6 mesi dopo l'assunzione di un carico di glutine, sempre per evidenziare la scomparsa delle lesioni istologiche (Ferreira M. et al., 1992).

1.7.2 Marcatori sierologici

Fermo restando che il “gold standard” per la diagnosi della malattia celiaca è rappresentato dalla dimostrazione delle lesioni istologiche tipiche, che regrediscono dopo l’eliminazione del glutine dalla dieta, sono stati fatti molti passi avanti nella diagnosi sierologica allo scopo di realizzare test di “screening” semplici ed affidabili in grado di identificare la malattia celiaca in soggetti appartenenti ai gruppi a rischio ovvero nei parenti di primo grado dei pazienti affetti, (Fasano A. et al., 2003) così come in coloro che hanno malattie autoimmuni come il diabete di tipo 1 (De Vitis I. et al., 1996; Sjöberg K. et al., 1998).

I test sierologici ora più usati nella pratica clinica comprendono il dosaggio di anticorpi anti-reticolina, anti-gliadina, anti-digiuno, anti-endomisio, e anti-tTG (Ferreira M. et al., 1992; Lerner A. et al., 1994; Yiannakou J.Y. et al., 1997; Dieterich W. et al., 1997; Sulkanen S. et al., 1998) (Tabella 2).

E’ importante ricordare che questi test sono negativi quando i pazienti con sprue celiaca intraprendono una dieta priva di glutine. Anche altri anticorpi legati all’alimentazione possono mostrare valori aumentati in maniera aspecifica, come conseguenza della maggiore permeabilità dell’intestino tenue nella sprue celiaca non trattata.

Serological test	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Positive predictive value	Negative predictive value
IgG AGA	57–78	71–87	0.2–0.9	0.4–0.9
IgA AGA	55–100	71–100	0.3–1.0	0.7–1.0
IgA EMA	86–100	98–100	0.98–1.0	0.8–0.95
IgA tTG	77–100	91–100	>0.9	>0.95
IgA tTG and EMA	98–100	98–100	>0.9	>0.95

Tabella 2. Caratteristiche funzionali dei marcatori sierologici per diagnosticare la malattia celiaca negli adulti. IgG: immunoglobuline G; IgA: immunoglobuline A; AGA: anticorpi anti-gliadina; EMA: anticorpi anti-endomisio; tTG: transglutaminasi tissutale.

Anticorpi anti-reticolina (ARA). Gli anticorpi anti-reticolina sono stati descritti nel 1971 usando l’immunofluorescenza. È stato recentemente rilevato che essi sono specifici, ma non molto sensibile per la sprue celiaca, un risultato confermato da un recente studio su 50 bambini celiaci e 25 controlli (Ciclitira P.J., 2001). Gli

anticorpi anti-reticolina non sono più comunemente utilizzati essendo stati sostituiti dal dosaggio degli anticorpi anti-endomisio e anti-tTG.

Anticorpi anti-gliadina (AGA). Sono i primi anticorpi messi in evidenza nei soggetti celiaci. Sono, infatti, anticorpi diretti contro un antigene esogeno, la α -gliadina dal glutine del grano. Nel siero dei soggetti affetti si trovano AGA negli isotipi IgA e IgG. Gli AGA di classe IgA presentano una sensibilità del 66-90% e una specificità dell'80-100%. Tali anticorpi segnano la normalizzazione della mucosa intestinale e spesso scompaiono dopo 6-12 mesi di dieta aglutinata. Infatti, la determinazione delle IgA è utile nella diagnosi della malattia in fase attiva e nel monitoraggio del comportamento alimentare dopo prescrizione della dieta priva di glutine. Essi sono valutati mediante immunofluorescenza indiretta su fegato di ratto e mediante ELISA (Ciclitira P.J., 2001). Gli AGA di classe IgG presentano, invece, una sensibilità dell'86-94% ed una specificità del 70-87%, infatti sono marcatori più sensibili, ma meno specifici degli AGA di classe IgA. Seguono la normalizzazione della mucosa intestinale dopo dieta aglutinata, ma spesso possono persistere, a basso titolo, nel siero di molti celiaci che seguono una corretta dieta aglutinata. La loro identificazione è però utile per evidenziare i casi con carenza di IgA, in quanto tale carenza nei soggetti celiaci sarebbe 10 volte più frequente che nella popolazione normale. La positività nei soggetti non celiaci sembrerebbe essere indice di un'aumentata permeabilità intestinale con maggiore passaggio di molecole, tra cui la gliadina, e successiva produzione di anticorpi. Pertanto, in fase attiva, si avranno valori elevati di IgA e di IgG, mentre dopo un periodo variabile da qualche mese a oltre un anno di dieta aglutinata, possono rimanere elevati solo i valori di IgG. Possono tuttavia presentarsi anche dei falsi positivi, rappresentati da soggetti con intolleranza alle proteine del latte vaccino, da pazienti affetti da morbo di Crohn e rettocolite ulcerosa, da soggetti affetti da patologie del connettivo a patogenesi immunitarie (Lupus Eritematoso Sistemico, artrite reumatoide, ecc) (Ciclitira P.J., 2001). Le metodiche di rilevazione sono analoghe a quelle già descritte per gli AGA di classe IgA. Questi anticorpi sono molto importanti per la diagnosi di celiachia nella prima infanzia, quando le altre classi anticorpali, anche a causa della breve durata della lesione, non sono ancora sufficientemente sviluppate. In caso di

positività è necessario eseguire un test di seconda battuta e cioè il dosaggio degli Ab anti-endomisio (Burgin-Wolff A. et al., 1990).

Anticorpi anti-digiuno (JAB). Gli anticorpi anti-digiuno sono stati identificati, anche se non sono stati ampiamente studiati nei programmi di screening. Sembra che essi esibiscano caratteristiche di legame simili agli ARA e a quelli anti-endomisio (Ciclitira P.J., 2001).

Anticorpi anti-endomisio (EMA). Sono autoanticorpi rivolti contro le proteine della matrice extracellulare che quindi alterano l'interazione tra fibroblasti e cellule epiteliali, compromettendo la struttura del villo. I primi EMA utilizzati nella diagnosi della MC appartengono alla classe delle IgA e si trovano nel siero dei soggetti che assumono glutine. Della gliadina, ai fini della produzione degli EMA, sarebbero essenziali due brevi sequenze NH₂-terminali, cioè i peptidi 31-43. Sperimentalmente, infatti, si è vista la produzione di EMA, da coltura di tessuto intestinale di soggetti con MC, dopo carico, *in vitro*, di peptidi 31-43 (Picarelli A. et al., 1996; 1999). Questi anticorpi si evidenziano mediante immunofluorescenza indiretta utilizzando come substrato sezioni di muscolo liscio del terzo distale dell'esofago di scimmia. Infatti, solo il terzo inferiore è ricco di proteine non collageniche (per esempio la reticolina) che reagiscono con gli EMA. Tuttavia, poiché il costo di tale test è molto elevato, e poiché l'utilizzo di animali da esperimento pone importanti interrogativi etici, sono stati recentemente utilizzati, con sempre maggiore frequenza, gli EMA su muscolo liscio del cordone ombelicale umano anche perché si è dimostrato che le caratteristiche di specificità e predittività sono completamente sovrapponibili per i due substrati. La sensibilità e la specificità degli EMA usando sia esofago di scimmia che cordone ombelicale umano come substrato, risultano del 97%-100% e del 98%-99%, rispettivamente (Ladinser B. et al., 1994). La sensibilità non arriva al 100% perché possono aversi dei falsi negativi in rapporto a carenza congenita di IgA e basso titolo di IgA. Un altro potenziale substrato per gli EMA è rappresentato da colture cellulari derivate da fibrille reticoliniche che circondano le fibre muscolari lisce delle pareti della vena e delle arterie del cordone ombelicale umano. Whelan et al. (1996) hanno dimostrato che la sensibilità e specificità di tale metodo per la sprue celiaca non trattata fosse del 100%, anche se dati ottenuti da altri ricercatori sono leggermente inferiori. La

ricerca degli EMA è però, notevolmente impegnativa in termini di tempo, esperienza dell'operatore e costi. Pertanto negli screening effettuati fino ad ora, erano considerati test di seconda battuta, in caso di positività degli AGA, e come preliminari alla biopsia intestinale (Figura 16).

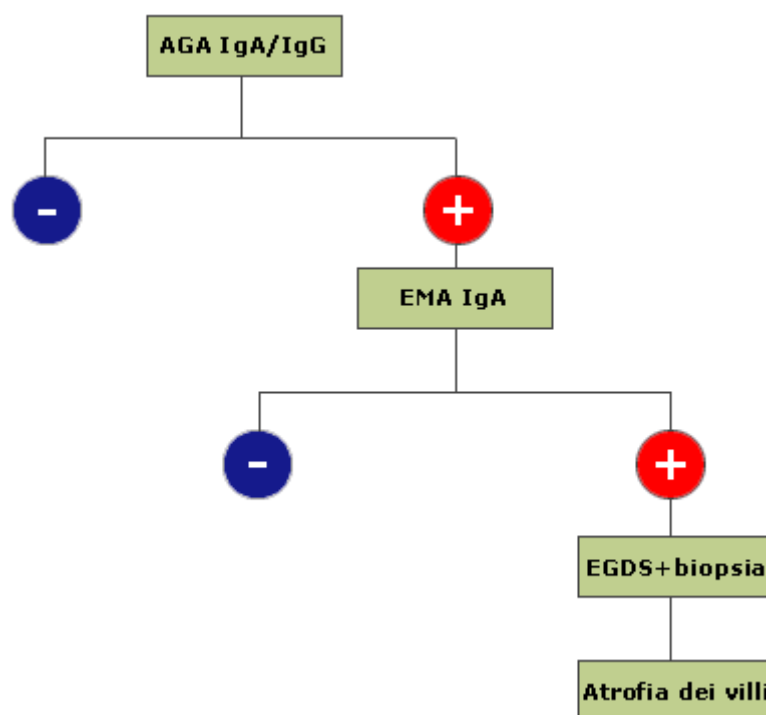


Figura 16. Rappresentazione schematica dei diversi test sierologici (AGA, EMA) da eseguire prima di arrivare alla diagnosi definitiva di celiachia mediante biopsia intestinale.

Proprio per le caratteristiche di specificità, in presenza di positività lievissime anche con una mucosa intestinale ancora “normale”, si deve pensare ad un marcatore precoce di una celiachia “latente”, piuttosto che di un falso positivo, in quanto tali anticorpi riconoscono lesioni minime della mucosa, purché queste derivino dal contatto con la gliadina. La presenza degli EMA non è stata considerata solo come un elemento diagnostico, ma anche come un fattore eziologico della lesione istologica, pertanto, il comportamento degli EMA, dopo dieta aglutinata, si è messo in rapporto con la persistenza della lesione. Una determinazione degli EMA a 3, 6 e 12 mesi dall'adozione della dieta priva di glutine, effettuata parallelamente ad un controllo del quadro istologico, ha evidenziato che solo una parte dei pazienti che

avevano avuto una sieroconversione presentava una normalizzazione del quadro istologico. Comunque la negativizzazione degli EMA è piuttosto lenta: dopo sei mesi infatti il 50% dei soggetti colpiti è ancora positivo e alcuni sono ancora positivi a distanza di 12 mesi. Sembra però che i soggetti ancora EMA-positivi avrebbero uno scarso adeguamento alla dieta e quindi la determinazione degli EMA, dopo la dieta aglutinata, è più utile per seguire l'aderenza alla dieta che la scomparsa della lesione intestinale (Dickey W. et al., 2000). La tecnica dell'immunofluorescenza utilizzata per rilevare la presenza degli EMA, però, ha posto il problema di quale fosse l'autoantigene su cui si fissassero tali anticorpi e questo è stato identificato nella transglutaminasi tessutale (tTG) (Dieterich W. et al., 1997).

Gli anticorpi anti-transglutaminasi (Anti-tTG). La scoperta che la tTG, l'enzima che catalizza la formazione di legami crociati nelle proteine, è "l'autoantigene maggiore" verso cui sono rivolti gli EMA, ha permesso di sviluppare un test immunoenzimatico che dà la possibilità di evidenziare e quantificare tali anticorpi nei confronti dell'antigene specifico dell'endomysio (Dieterich W. et al., 1997; Troncone R. et al., 1999). La differenza tra gli EMA e gli Anti-tTG di classe IgA e IgG è data dal fatto che i primi sono un complesso in cui sono compresi anche gli anticorpi anti-muscolo liscio, mentre i secondi sono specifici per l'antigene transglutaminasi. Inoltre, la tecnica d'immunofluorescenza pur essendo relativamente semplice è scomoda e, soprattutto dipendente dall'interpretazione soggettiva del microscopista; un sistema ELISA quantitativo, al contrario, non è soggetto a variazioni interosservatore ed è più facile da eseguire. La facilità di analisi degli anticorpi anti-tTG, mediante un sistema ELISA, rispetto all'analisi degli EMA ha permesso di abbandonare gli EMA e di sostituirli con gli Ab anti-tTG, anche quando vengono richiesti gli EMA. La determinazione degli Anti-tTG presenta, infatti, sensibilità e specificità simili agli EMA, sia nella diagnosi che nel "follow-up", ma, come gli EMA, gli Anti-tTG risultano falsamente negativi nella carenza di IgA. Nei casi positivi o borderline vanno comunque eseguiti gli EMA, per la loro specificità prossima al 100%. (Figura 17).

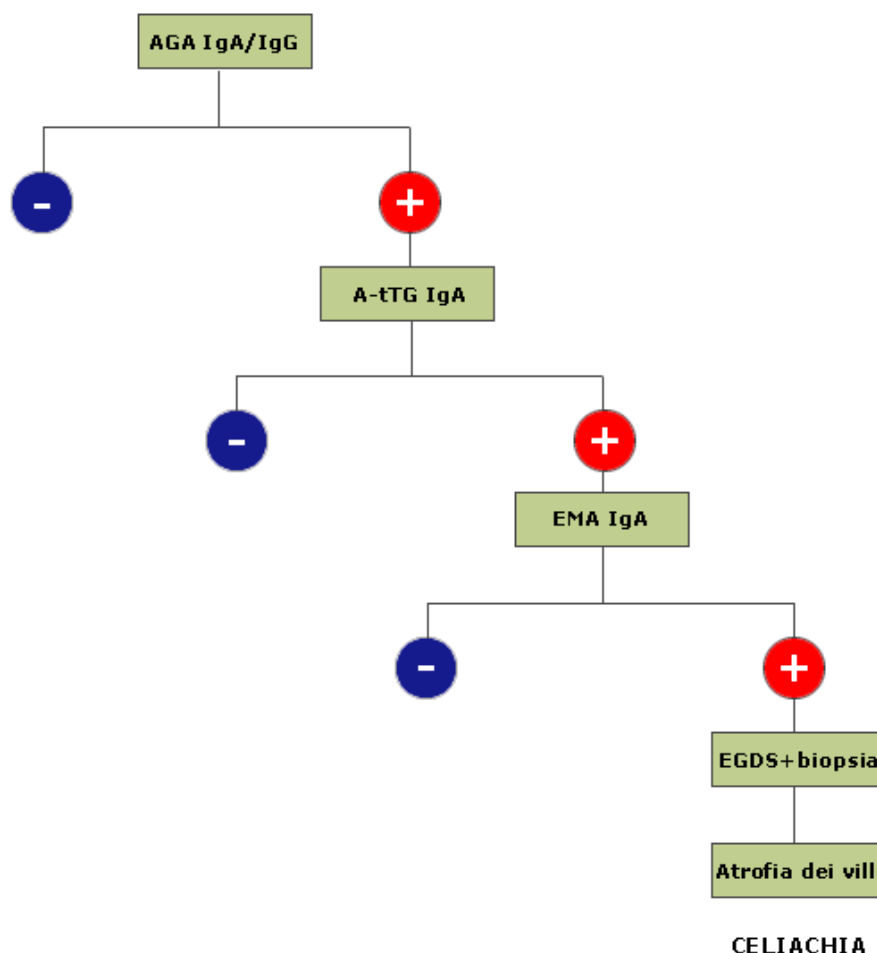


Figura 17. Rappresentazione schematica dei diversi test sierologici (AGA, Anti-tTG, EMA) da eseguire prima di arrivare alla diagnosi definitiva di celiachia mediante biopsia intestinale.

Questo metodo, molto utilizzato negli Stati Uniti, è comunque avvalorato da studi che mostrano un'alta correlazione tra titolo Anti-tTG e positività EMA (Dieterich W. et al., 1998). Recentemente, in uno studio condotto su 365 pazienti celiaci a dieta normale e su 41 pazienti a dieta priva di glutine, sono stati monitorati l'adesione del paziente celiaco alla dieta senza glutine e le reazioni sierologiche conseguenti all'ingestione di glutine; lo studio ha mostrato una stretta correlazione tra la durata della dieta priva di glutine ed i livelli di anticorpi IgA anti-tTG, indicando, quindi, chiaramente che questi anticorpi possono essere utilizzati come un'alternativa valida agli EMA, osservatore-indipendente, per la "diagnosi" e il "follow-up" dei pazienti celiaci a dieta senza glutine (Burgin-Wolff A. et al., 2002).

Di recente, tali test si possono eseguire anche su saliva. È stato dimostrato, infatti, che utilizzando la tecnica RIA (radioimmunoassay) in fase fluida, per campioni di saliva di pazienti celiaci, è possibile determinare il titolo degli anticorpi IgA anti-tTG (Bonamico M. et al., 2004). Questo metodo, oltre ad essere non invasivo e semplice da eseguire, è molto sensibile. Ancora più recentemente, è stata sviluppata un'analisi immunocromatografica per individuare facilmente e velocemente anticorpi anti-tTG (Sorell L. et al., 2002). Quest'analisi può essere considerata una strategia alternativa utile per analizzare la malattia celiaca, anche se rimane una procedura semiquantitativa. Comunque, tutto ciò indica in maniera chiara la necessità di metodi pratici, alternativi alla biopsia, per lo “screening” di massa e il “follow-up” della celiachia.

1.8 Trattamento e “follow-up”

1.8.1 La dieta priva di glutine

La dieta senza glutine è la base di tutti i trattamenti della malattia celiaca e dovrebbe essere raccomandata a tutti i pazienti una volta che la diagnosi è stata fatta correttamente (Sollid L.M. and Lundin K.E.A., 2009). La dieta priva di glutine implica una dieta senza frumento, orzo, segale, e tutti i cereali strettamente connessi incluso il farro (una variante del grano). L'avena è un cereale correlato che è tollerato da quasi tutti i celiaci, anche se sono stati segnalati casi sporadici d'intolleranza. Altri cereali sono però tollerati, tra cui mais, riso e sorgo. E' stato molto difficile dimostrare una soglia definita “livello di sicurezza” per l'assunzione di glutine e ciò probabilmente è dovuto alla natura poligenica e multifattoriale del disturbo. Sembra che l'assunzione di 50-100 mg di glutine al giorno è una concentrazione sicura per la maggior parte dei pazienti celiaci (Stern M. et al., 2001). Una dieta completamente senza glutine è difficile da realizzare a causa dei bassi livelli di contaminazione nei prodotti alimentari e per l'uso di glutine nell'industria alimentare. L'uso di amido di frumento come base per il pane aggiunge glutine al carico totale, questo, però è “permesso” in alcuni ma non in tutti i paesi. Anche la birra è un'altra fonte di glutine a causa del contenuto di proteine dell'orzo maltato (Sollid L.M. and Lundin K.E.A., 2009).

La dieta senza glutine, dunque, è povera di fibre, e quindi può indurre fastidiose costipazioni. Questo di solito risponde all'aggiunta di crusca di riso nella regolare dieta. Inoltre, le specifiche carenze dietetiche che si verificano, a causa del malassorbimento intestinale dovuto all'atrofia dei villi, devono essere corrette. Queste carenze includono ferro, acido folico, calcio e, molto raramente, deficit di vitamina B12. Dopo 3-4 mesi di terapia con una dieta priva di glutine, una ripetizione della biopsia intestinale può essere eseguita per esaminare la morfologia della mucosa biotica dell'intestino tenue. In caso di alterazioni persistenti, altre possibili cause di atrofia dei villi intestinali come la giardiasi, o l'allergia al latte vaccino, dovrebbero essere escluse. Anche se si verifica un miglioramento sintomatico, la dieta deve essere costante e la procedura di biopsia intestinale può essere ripetuta dopo ulteriori 6-9 mesi. Un miglioramento nella morfologia della biopsia intestinale e dei sintomi normalmente avviene con una diminuzione dei titoli anticorpali contro gliadina, reticolina, endomisio, e tTG. In caso di dubbi circa la corretta diagnosi, è consigliato ripetere la procedura di biopsia intestinale dopo un carico di glutine (Ciclitira P.J., 2001).

1.8.2 Il “follow-up”

Dopo la valutazione iniziale, la diagnosi, e l'avvio di una dieta priva di glutine, si pone la questione di quanto frequentemente il “follow-up” dovrebbe verificarsi. È stato ipotizzato che la stragrande maggioranza dei pazienti vive bene con stretta aderenza a una dieta priva di glutine. È consigliato che la valutazione annuale debba essere fatta considerando il peso, la conta ematica completa, i valori dell'acido folico, calcio e fosfatasi alcalina. La valutazione sierologica con anticorpi anti-gliadina, reticolina, endomisio o tTG può essere utile perché titoli elevati, implicano continua ingestione di glutine. Il “follow-up” dovrebbe essere, dunque permanente. Questo è a sostegno della continua necessità di un rigoroso rispetto della dieta senza glutine e della tempestiva individuazione di qualsiasi problema (Ciclitira P.J., 2001).

1.9 Le nuove terapie

Vi è l'esigenza di trattamenti alternativi nella malattia celiaca. Le nuove informazioni della patogenesi hanno dato altri obiettivi su cui intervenire. Molte nuove terapie hanno, infatti, raggiunto la sperimentazione clinica (Tabella 3).

Mode of action	Compound	Compound class	Manufacturer	Status	ClinicalTrials.gov identifier	References
Chemokine receptor antagonist	CCX282-B (Traficet)	Small molecule	ChemoCentryx, USA	Phase II	NCT00540657	
Zonulin antagonist	Larazotide acetate (AT-1001)	Peptide	Alba Therapeutics, USA	Phase II	NCT00620451 NCT00492960	23
Glutenase	ALV003	Enzymes	Alvine Pharma, USA	Phase I	NCT00669825 NCT00626184	20
Glutenase	<i>Aspergillus niger</i> prolyl endoprotease	Enzyme	DSM, the Netherlands	Preclinical	—	21
Peptide vaccination	Immunodominant gluten peptides	Peptide	Nexpep, Australia	Preclinical	—	
Immune modulation by hookworm	<i>Necator americanus</i>	Parasite	Princess Alexandra Hospital, Brisbane, Australia	Phase II	NCT00671138	
Transglutaminase inhibition	KCC009 (Transglutaminase inhibition)	Small molecule	—	Discovery	—	26
HLA blockage	HLA-DQ2 or HLA-DQ8 blockers	—	—	Discovery	—	28–29
Gluten sequestering polymer	P(HEMA-co-SS)	Polymer	—	Discovery	—	22
Anti-IL-15	AMG-714	Humanized mAb	Amgen, USA	Phase II in RA	NCT00433875	

Tabella 3. Nuove terapie potenziali per la malattia celiaca. HLA: Antigene Leucocitario Umano; IL: Interleuchina; mAb: anticorpi monoclonali.

Due terapie mirano a prevenire che il glutine entri in contatto con la mucosa del sistema immunitario: o per via orale mediante supplementazione di enzimi che aumentano la ripartizione del glutine in frammenti che non sono più immunostimolatori (Gass J. et al., 2007; Stepniak D. et al., 2006) o con l'aggiunta di un polimero che sequestri le proteine del glutine (Pinier M. et al., 2008). Quando si tratta della supplementazione orale di glutenasi, due farmaci sono adesso in fase di sviluppo. L'ALV003 consiste in una combinazione di proteasi cisteina glutammina-specifica (EP-B2) e una prolil-endoproteasi batterica prolina-specifica (Gass J. et al., 2007). I due enzimi hanno attività gastrica e agiscono in concerto. Un altro enzima che è efficace per la frammentazione del glutine e che ha anche attività gastrica è una prolil-endoproteasi da *Aspergillus niger* (Stepniak D. et al., 2006). Studi clinici per la malattia celiaca sono in corso o inizieranno presto

per questa classe di composti. Un approccio che ha anche come bersaglio l'antigene glutine di per sé, è quello di creare tipi modificati di grano, che sono privi di sequenze immunostimolanti. Questo potrebbe essere ottenuto con metodi di selezione convenzionali o più probabilmente con organismi geneticamente modificati. Il largo numero di epitopi peptidici differenti trovati in diverse classi di proteine del glutine (α e γ -gliadine così come le glutenine), che sono codificati in diversi loci nel genoma del grano, rappresenta una sfida per il successo di questo metodo. Un'altra strategia mira a correggere un difetto della barriera epiteliale che è associato con la malattia celiaca. Un aumento delle perdite della barriera porterà a un aumento dell'esposizione ai peptidi immunostimolanti del glutine così come altri composti che possono essere coinvolti per l'omeostasi intestinale. L'inibitore della zonulina AT1001 sta riducendo la disfunzione della barriera indotta dal glutine (Paterson B.M. et al., 2007) e questo composto è entrato in fase II di sperimentazione. Si può anche immaginare un trattamento per la malattia celiaca impedendo l'attivazione delle cellule T CD4⁺ reattive al glutine. Questo può essere perseguito prevenendo la formazione di peptidi deamidati, o bloccando il sito di legame peptidico delle molecole presentanti il glutine, HLA DQ2 e DQ8 (Sollid L.M. & Khosla C., 2005). Questo tipo di ricerca è in corso per preparare farmaci che interferiscano con questi processi. Sono state sviluppate diverse classi di inibitori della tTG (Hausch F. et al., 2003; Choi K. et al., 2005; Pardin C. et al., 2008), così come composti simili ai peptidi che legano specificamente l'HLA-DQ2 e inibiscono il riconoscimento dei peptidi del glutine dalle cellule T (Xia J. et al., 2007; Kapoerchan V.V. et al., 2008). L'identificazione di epitopi del glutine implicati nella risposta delle cellule T CD4⁺ al glutine ha aperto anche la possibilità di una vaccinazione contro il peptide al fine di tollerare le cellule T reattive al glutine. L'identificazione di epitopi dominanti, verso i quali ci sono risposte in tutti i pazienti celiaci, è un passo importante verso la realizzazione di questo concetto. Tuttavia, per il successo, quest'approccio richiederà l'induzione della tolleranza a tutti gli epitopi (compresi quelli che sono più di rado riconosciuti) attraverso vaccinazione con pochi epitopi immunodominanti. Si prevede che quest'approccio sarà utilizzato per studi clinici. Vi è anche una fase II in corso di sperimentazione clinica per la malattia celiaca, con l'obiettivo di verificare se un'infezione intestinale dovuta all'attacco di un verme cambierà la modalità di risposta immunitaria locale

e sopprimerà la sensibilità al glutine nelle persone affette. In caso di successo nella malattia celiaca, questo trattamento sarà utilizzato per la sperimentazione anche di malattie croniche dell'intestino. La terapia che ha l'obiettivo di interferire con le citochine è stata utilizzata con successo per varie malattie autoimmuni, e si tenta anche con una pletora di nuove modalità terapeutiche. Tuttavia, a causa degli innumerevoli effetti collaterali indotti dal trattamento per la celiachia, è improbabile che questa stessa malattia possa essere un'indicazione primaria per la maggior parte di queste terapie. La terapia anti-IL15 potrebbe essere un'eccezione a questo, perché il trattamento anti-IL15 è stato prospettato come terapia per malattia celiaca refrattaria. In caso di successo nella malattia celiaca refrattaria, la forma di celiachia non complicata potrebbe anche diventare un'indicazione (Sollid L.M. and Lundin K.E.A., 2009).

In conclusione, diversi nuovi strumenti diagnostici sono emersi per la malattia celiaca e molti aspetti della patogenesi sono ben compresi. Altri aspetti restano ancora meno chiari, quindi l'identificazione di nuovi geni a rischio (Hunt K.A. et al., 2008) probabilmente aiuterà ad aumentare le intuizioni sul funzionamento del sistema immunitario in questa patologia. Tuttavia, il trattamento con la dieta aglutinata rappresenta ancora l'unica scelta clinica, ma è possibile prevedere che molte nuove possibilità terapeutiche potranno essere introdotte nel prossimo futuro.

Capitolo II

SCOPO DEL LAVORO

La diagnosi definitiva di celiachia è eseguita attraverso l'esame biotico della mucosa digiunale. Tuttavia, la possibilità di avere metodi più pratici e meno invasivi rispetto a quelli istopatologici, può rappresentare una prospettiva importante al fine di compiere "screening" di massa e per il "follow-up" della malattia celiaca. Lo sviluppo di un sistema di analisi quantitativo più semplice e rapido, quale un biosensore proteico per la determinazione degli anticorpi anti-transglutaminasi tissutale, rappresentanti un marker sierologico per la celiachia, è da considerarsi, quindi, una strategia estremamente utile e innovativa, tanto da rappresentare l'obiettivo prioritario di tale progetto di ricerca. L'aspetto chiave di tale tecnologia è racchiuso nella capacità di produrre un segnale luminoso, quando è rilevato un analita (Ab anti-tTG) nel siero o nella saliva dei pazienti affetti, tanto da metterli in condizione di seguire il "follow-up" della malattia in modo semplice e immediato. In particolare, tale progetto prevede la messa a punto di un saggio fluorescente competitivo basato sulla tecnica "molecular beacons", che utilizza la presenza di un fluoroforo donatore e di un accettore coniugati a due differenti molecole biologiche, che nel caso specifico sono rappresentati dalla tTG da cavia (*Guinea pig*) e dagli Ab anti-tTG da coniglio.

2.1 I biosensori

I biosensori sono strumenti analitici i cui elementi di riconoscimento sono costituiti da reagenti di affinità di origine biologica (così come acidi nucleici, enzimi e anticorpi), generalmente immobilizzati su un supporto solido, cui è accoppiato un apparato di trasduzione che rende visibile e quantificabile l'interazione con l'analita, in altre parole con la sostanza d'interesse per la determinazione analitica. Infatti, l'interazione tra l'elemento di riconoscimento e l'analita specifico origina un segnale (spettroscopico, potenziometrico, ecc), che a sua volta è amplificato, trasdotto e infine quantificato (Figura 18). I vantaggi dei biosensori, rispetto ai più convenzionali sensori di tipo chimico e fisico, sono la specificità del riconoscimento e la sensibilità, nonché la risposta quantitativa e veloce. Tali proprietà derivano

dalla natura del reagente di affinità d'origine biologica presente nel biosensore, che nella maggior parte dei casi è costituito da proteine, quali enzimi e anticorpi. L'uso di tali proteine come elementi di riconoscimento è spiegato dunque, dall'affinità e specificità di legame che esse mostrano nei confronti dei loro ligandi. Altri vantaggi dell'uso delle proteine nella realizzazione di un biosensore sono racchiusi nella loro solubilità in acqua, nei relativi bassi costi di produzione e, tenendo conto dei progressi della genetica molecolare, anche nella possibilità di migliorare o cambiare alcune proprietà proteiche mediante manipolazione genetica.

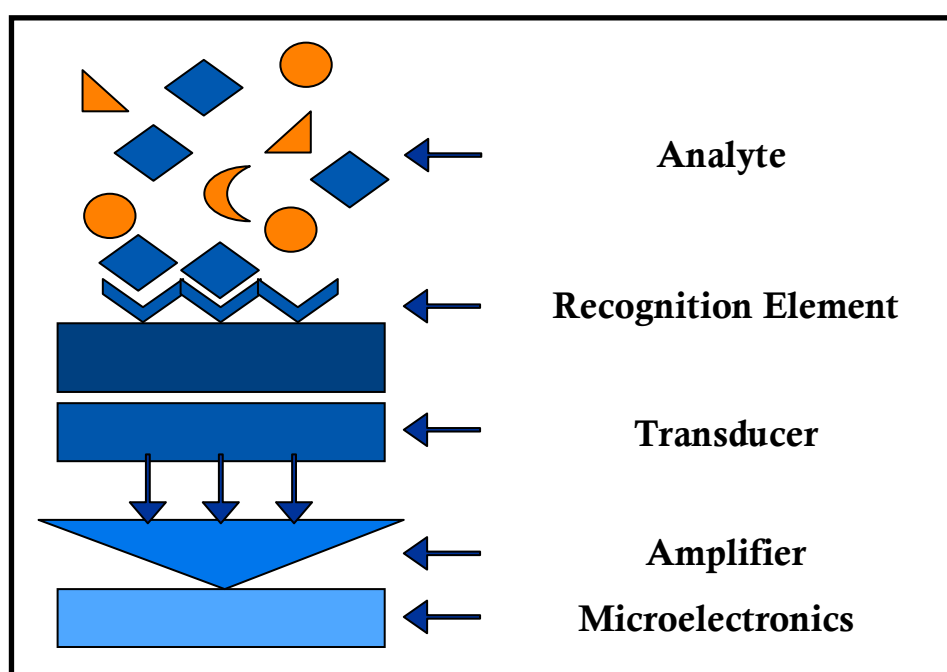


Figura 18. Esempio schematico di un biosensore.

2.2 Obiettivi del Progetto di Ricerca

Al fine di sviluppare un nuovo biosensore fluorescente competitivo per lo “screening” e il “follow-up” di pazienti celiaci l’attività sperimentale ha previsto il raggiungimento dei seguenti obiettivi intermedi:

1. Produzione reagenti necessari per lo sviluppo del biosensore. Nella prima fase del progetto, infatti, l’attenzione è stata concentrata sulla realizzazione di un’opportuna strategia di clonaggio del gene della gptTG e di un efficiente sistema di espressione della proteina ricombinante in uno specifico ceppo batterico di

Escherichia coli. A questo sono seguiti una serie di tentativi di messa a punto di un efficace metodo di purificazione per la gptTG ricombinante che al momento non è stato ancora stabilito. Tutto ciò al fine di abbattere gli alti costi delle preparazioni enzimatiche di gptTG commercialmente disponibili. In contemporanea, l'attività di ricerca ha previsto la produzione e quindi la purificazione di anticorpi policlonali anti-tTG in coniglio. Tale approccio è stato scelto nell'ottica di sviluppare successivamente specifici anticorpi monoclonali utili per la standardizzazione dell'analisi.

2. Marcatura con sonde fluorescenti degli anticorpi anti-tTG da coniglio e della tTG da cavia, rispettivamente. In questa seconda fase del progetto, i campioni in esame sono stati marcati con opportune sonde fluorescenti tenendo conto della “distanza di Förster” in cui si verifica trasferimento di energia (RET) tra i fluorofori utilizzati.

3. Studi di Spettroscopia di Fluorescenza. Al fine di studiare le interazioni tra la gptTG e gli anticorpi anti-tTG da coniglio si è pensato, di sfruttare il fenomeno della FRET, principio ampiamente applicato per la rilevazione analitica nella diagnostica clinica e nelle biotecnologie. Nello specifico, sono state eseguite misure di fluorescenza in stadio stazionario (steady-state) e risolta nel tempo (lifetime).

4. Immobilizzazione non covalente della tTG marcata su supporto solido. La gptTG è stata immobilizzata su vetrino, in quanto, le proteine immobilizzate sono spesso più stabili di alcune proteine in soluzione, ma anche perché la dinamica delle interazioni tra Ag-Ab può cambiare in soluzione, causando quindi, variazioni nei valori di FRET, quando tali molecole sono marcate con una coppia di fluorofori che si comporta da donatore/accettore di energia.

5. Sviluppo di un saggio fluorescente basato su misure di fluorescenza “front-face”. La maggior parte dei saggi immunologici, oggi in uso, è basata sull'utilizzo di piastre multi-pozzetto, per cui al fine di simulare tale sistema, si è pensato di eseguire gli esperimenti, in precedenza fatti in soluzione, sfruttando la configurazione “front-face”, ovvero immobilizzando i campioni in esame su supporto solido, che tra i diversi vantaggi, presenta anche quello dell'eliminazione

di una serie di soluzioni di lavaggio intermedie, necessarie ad esempio, per la realizzazione di un saggio ELISA.

6. Studi d'interazione tra Ag-Ab a livello di singola molecola. Al fine di una miglior comprensione delle dinamiche d'interazione realizzatesi tra la gptTG e gli Ab anti-tTG, l'ultima parte del progetto ha previsto lo studio del legame Ag-Ab mediante l'utilizzo di tecniche come la Spettroscopia di Correlazione di Fluorescenza (FCS) e la PIE-FRET (pulsed-interleaved excitation FRET) associata al TCSPC (time-correlated single photon counting), le quali hanno permesso una migliore caratterizzazione dei singoli legami molecolari stabilitisi tra antigene ed anticorpo.

7. Ottimizzazione della tecnica fluorescente, in modo da ottenere un basso background, un'alta sensibilità e specificità. La parte sperimentale si è terminata con l'utilizzo di una metodica che sfrutta la configurazione "front-face" e, i principi della Microscopia Confocale, associati alle proprietà dei metalli che si è dimostrato, aumentano l'intensità di fluorescenza di un fluoroforo, migliorandone anche la propria fotostabilità.

Tutto ciò è stato sviluppato al fine di trasferire la nuova tecnologia a industrie operanti nel settore della diagnostica clinica, essendo il mercato della diagnostica per la celiachia in enorme espansione.

Capitolo III

MATERIALI E METODI

3.1 Materiali

3.1.1 Ceppi batterici

Il ceppo di *Escherichia coli* TOP10F' con il genotipo: F' {*lacI^q*, Tn10 (Tet^r)} *mcrA* Δ (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *deoR* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*) 7697 *galU* *rpsL* (Str^r) *endA1* *nupG* e il ceppo di *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star con il genotipo: F' -*ompT* *hsdSB* (*rB-mB*-) *gal* *dcm* *rne131*(DE3) sono stati acquistati alla Invitrogen.

3.1.2 Vettori plasmidici ed enzimi

Il vettore plasmidico, pGEM-T Easy, usato per il clonaggio del gene della *gptTG*, è stato acquistato dalla Promega; il vettore plasmidico pET-28(a) utilizzato per le prove di espressione della proteina tTG è stato fornito dalla Novagen. Gli enzimi di restrizione NdeI/XhoI e i relativi tamponi sono stati acquistati dalla Roche. LaTaq polimerasi HiFi utilizzata è dell'Invitrogen; la T4 DNA ligasi della Roche.

3.1.3 Reagenti

Gli standard chimici, i solventi e i tamponi sono stati acquistati alla Sigma-Aldrich. Tutte le soluzioni sono state preparate usando acqua deionizzata, ulteriormente purificata mediante il sistema Milli-Q della Millipore.

Il plasmide ricombinante pKTG1 contenente il cDNA della transglutaminasi di *Guinea pig* è stato gentilmente fornito dal Prof. K. Ikura del Dipartimento delle Scienze del Cibo e delle Tecnologie, della Facoltà di Agricoltura dell'Università di Kyoto, Giappone (Ikura K. et al., 1990).

I sieri di anticorpi policlonali anti-*gptTG* prodotti da coniglio sono stati forniti dall'IgTech, (Paestum (SA) - Italia).

Le preparazioni commercialmente disponibili di transglutaminasi tissutale da fegato di *Guinea pig*, usate per eseguire gli esperimenti, sono state fornite dalla Zedira GmbH (Darmstadt, Germany).

I fluorofori DyLight Fluor 594 e DyLight Fluor 649 nella loro forma reattiva sono stati acquistati alla Thermo Fisher, (New Jersey).

I componenti utilizzati per l'elettroforesi e per la quantizzazione di DNA e proteine sono della Bio-Rad.

Tutti gli altri reagenti utilizzati sono preparazioni commerciali della migliore qualità disponibile (vedi testo).

3.2 Metodi

3.2.1 Produzione della transglutaminasi tissutale ricombinante in *Escherichia coli*

Al fine di utilizzare un comune protocollo di purificazione mediante rapida cromatografia d'affinità, che prevede l'immobilizzazione di ioni-metallici sulla resina d'interesse, utile per la produzione di enzimi ricombinanti in buona quantità e con un alto grado di purezza, è stato necessario aggiungere una coda esaistidinica (His6) all'estremità N-terminale del gene della gptTG. Per realizzare ciò, è stato necessario sostituire il vettore di espressione in cui ci è pervenuto il gene della gptTG. Sono stati introdotti dunque, due nuovi siti di restrizione enzimatica alle estremità N-terminale e C-terminale del gene della gptTG necessari per l'inserimento di quest'ultimo nel nuovo vettore di espressione selezionato e ciò è stato ottenuto mediante applicazione della tecnica di PCR.

3.2.1.1 Progettazione dei “primer”

Due “primer” che definissero le regioni N-terminale e C-terminale del gene della gptTG sono stati opportunamente progettati per garantire il successo globale della reazione. Al fine di evitare la formazione di “primer” dimerici nella miscela di reazione, entrambi gli oligonucleotidi disegnati non erano complementari tra loro all'estremità 3'. Inoltre, la percentuale di G/C è stata mantenuta intorno al 50-60%, la distribuzione dei domini ricchi di G/C e A/T era equilibrata e la temperatura di Melting (Tm) calcolata era di 50-60 °C. Il “primer” TGluFw: 5'- AGGAATTCC**CATATG**GCAGAGGATCTGATCCTGGAG -3', riconosceva 11 nucleotidi a monte del codone d'inizio ATG (sottolineato) all'estremità 5' della regione codificante del gene ed introduceva un unico sito di restrizione per

l'endonucleasi NdeI (grassetto). Il "primer" TgluRv: 5'- ACCG**CTCGAG**TTAGGCGGGGCCGATGATGACGTTCCG -3', si legava a 21 nucleotidi a valle del codone di stop TTA (sottolineato) all'estremità 3' della regione codificante il gene della gptTG, introducendo un unico sito di restrizione per l'enzima XhoI (grassetto). Le sequenze AGGAATTC nel "primer" 5'-TGluFw e ACCG nel "primer" 3'-TGluRv erano necessarie per il funzionamento degli enzimi di restrizione nella tecnica di clonaggio di seguito descritta. Infine, è stata necessaria la progettazione di altri due "primer" interni che andassero a riconoscere, quindi legare, le regioni vicine a quelle in parte già sequenziate, al fine di completare l'analisi di sequenza genica. Le sequenze oligonucleotidiche utilizzate sono state: il "primer" tTGintFw: 5'- TGCTCTACAATCCCTGGTGC -3', che riconosceva la zona prossimale all'estremità 5' del cDNA del gene della gptTG e il "primer" tTGintRv: 5'- AGGGATCCAGGGTCAGGTTGAGC -3', che invece legava la zona prossimale all'estremità 3'. Tutti gli oligonucleotidi progettati sono stati forniti da PRIMM srl, Milano - Italia.

3.2.1.2 Amplificazione per PCR (Polymerase Chain Reaction)

Il cDNA della transglutaminasi tissutale di *Guinea pig* è stato amplificato mediante PCR dal plasmide pKTG1, usando i "primer" TGluFw e TGluRv precedentemente progettati. La reazione di PCR è stata eseguita in condizioni standard.

Prima dell'inizio dei cicli termici d'amplificazione del DNA, il programma di PCR ha previsto uno step a 95 °C per 5 minuti, al fine di indurre l'attivazione della Taq polimerasi e un'iniziale denaturazione del DNA template. I cicli di denaturazione, appaiamento ed estensione si sono basati sulla ripetizione per trenta volte dei seguenti passaggi: denaturazione a 95 °C per 1 minuto, appaiamento a 52 °C per 1 minuto, estensione a 72 °C per 2 minuti. Dopo l'ultimo ciclo di amplificazione i campioni sono stati sottoposti a una temperatura di 72 °C per 8 minuti, al fine di promuovere la complementazione dei prodotti parziali di estensione e l'appaiamento dei prodotti di PCR complementari a singolo filamento. Infine, i campioni sono stati lasciati alla temperatura di 4 °C.

La verifica dei prodotti di amplificazione è stata eseguita mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% in presenza di 5 µg/µl di bromuro d'etidio

(BrEt) e successivamente, i prodotti di PCR sono stati purificati, cioè separati da primer, nucleotidi liberi, soluzioni tampone e enzimi, con un opportuno kit di estrazione da gel (QIAEXII kit, Qiagen).

3.2.1.3 Clonaggio nel vettore plasmidico pGEM-T Easy

I frammenti di cDNA NdeI/XhoI provenienti dalla reazione di amplificazione per PCR sono stati poi inseriti nel vettore plasmidico pGEM-T Easy (Promega), utilizzando la T4 DNA Ligasi. La miscela di reazione è stata incubata per 16 ore a 16 °C e poi utilizzata per la trasformazione del ceppo di cellule di *E. coli* Top10F', ad alta efficienza ($\geq 1 \times 10^8$ cfu/ μ g DNA), reso competente mediante reazione con cloruro di rubidio (protocollo non riportato).

3.2.1.4 Trasformazione delle cellule competenti

A 200 μ l di cellule competenti (*E. coli* Top10F') è stata aggiunta la preparazione plasmidica (100 ng di DNA plasmidico) e il tutto è stato tenuto a 4 °C per 30 minuti. In seguito, la sospensione è stata incubata a 42 °C per 60 secondi e poi è stata messa in ghiaccio a raffreddare per 2 minuti. Infine, sono stati aggiunti 800 μ l di terreno Luria-Bertani (LB) (per 1 l di terreno LB: Bacto-triptone 10 g, "Bacto-yeast extract" 5 g, NaCl 10 g, H₂O deionizzata fino a volume), per un volume finale di 1 ml. Dopo un'ora d'incubazione a 37 °C, con agitazione meccanica di \approx 150 rpm, 200 μ l di soluzione cellulare sono stati depositi su terreno LB solido con antibiotico (15% w/v + LB AGAR 100 mg/ml Amp + 200 mg/ml IPTG + 20 mg/ml X-Gal); i restanti 800 μ l sono stati centrifugati a 16000 x g per 1 minuto, 600 μ l di surnatante sono stati allontanati e i 200 μ l di soluzione cellulare rimasta (concentrata 4 volte), sono stati spalmati in capsula Petri contenente terreno LB solido, con antibiotico. Per la crescita, le piastre cellulari sono state incubate a 37 °C per 16 ore.

Il vettore pGEM-T Easy ad alto numero di copie possiede un gene per la resistenza all'antibiotico Ampicillina (Amp), caratteristica utilizzata per la selezione dei batteri trasformanti. Esso contiene i promotori T7 e SP6 della RNA polimerasi fiancheggianti una regione di clonaggio multiplo, la quale contiene al suo interno la regione codificante l' α -peptide dell'enzima β -galattosidasi. Un'eventuale inserzione di DNA in questo punto porterebbe all'inattivazione dell' α -peptide, per cui, i batteri

che hanno perso l'attività β -galattosidasi non sono più in grado di idrolizzare il galattosio. Tale caratteristica è stata utilizzata come ulteriore metodo di selezione dei cloni ricombinanti. Infatti, i batteri trasformanti, cioè contenenti al loro interno il vettore plasmidico con uno specifico inserto di DNA, cresciuti in presenza di X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galattopiranoside), non riescono a degradare le molecole di X-Gal restando incolore. Al contrario, i batteri non trasformati si colorano di blu. Sono state, dunque, selezionate in maniera del tutto casuale, alcune colonie batteriche bianche. Al fine di verificare la sequenza del cDNA della tTG, le colonie batteriche sono state inoculate in terreno LB + 50 mg/ml Amp e cresciute a 37 °C per 16 ore; dopo di che sono state eseguite delle miniprep (estrazioni plasmidiche) per analizzare il DNA plasmidico ottenuto (QIAprep SpinMiniprep). In seguito, è stata eseguita una digestione enzimatica utilizzando gli enzimi di restrizione NdeI e XhoI (Roche), al fine di isolare e quindi verificare la presenza del cDNA della tTG all'interno del vettore plasmidico pGEM-T Easy. La miscela di reazione è stata incubata a 37 °C per 2 ore e i prodotti di digestione enzimatica sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 1% in presenza di 5 μ g/ μ l di bromuro d'etidio (BrEt). Al fine di verificare l'integrità del cDNA così ottenuto, è stato effettuato un sequenziamento genico (PRIMM-Seqcore, Napoli - Italia).

3.2.1.5 Clonaggio nel vettore d'espressione pET-28(a)

Dopo l'analisi di sequenza, il cDNA della tTG è stato clonato nel vettore di espressione pET-28(a) (Novagen), che codifica per una coda esaistidinica all'estremità N-terminale del modulo ricombinante, seguita dal sito di taglio per la trombina, che fornisce la possibilità di rimuovere la coda di istidine producendo, dunque, una proteina quasi nativa (i residui Gly-Ser-His restano insieme alla Met d'inizio a seguito del taglio con la trombina).

Sia il vettore di espressione pET-28(a) che il plasmide pGEM-T Easy ricombinante (con l'inserto di cDNA della tTG) sono stati sottoposti a una doppia digestione enzimatica, utilizzando le endonucleasi NdeI e XhoI, per generare filamenti di DNA con estremità altamente compatibili per la seguente procedura di clonaggio.

Entrambe le miscele di reazione sono state incubate a 37 °C per 2 ore e quindi analizzate mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 1% in presenza di

5 µg/µl di bromuro d'etidio (BrEt). Il frammento di ≈ 2 KB, corrispondente al cDNA della tTG ottenuto dalla doppia digestione di pGEM-T Easy, e il frammento di ≈ 5 KB, corrispondente al pET-28(a) linearizzato dalla doppia digestione enzimatica, sono stati estratti separatamente da gel, con un opportuno kit di estrazione (QIAEXII kit, Qiagen). La reazione di ligasi del cDNA della tTG con il vettore di espressione, infine, è stata eseguita nelle stesse condizioni sopra specificate, utilizzando 35 ng di cDNA della tTG NdeI/XhoI e 60 ng di pET-28(a) NdeI/XhoI. Successivamente, le cellule Top10F', altamente competenti, sono state trasformate. I cloni isolati dalle piastre di selezione (15% w/v LB AGAR + 50 mg/ml Kan) sono stati coltivati in terreno LB + 50 mg/ml Kan (canamicina) a 37 °C per 16 ore e poi sono state eseguite estrazioni plasmidiche per analizzare i prodotti ottenuti. Una doppia digestione enzimatica, eseguita con gli enzimi di clonaggio NdeI e XhoI, ha rivelato che i cloni isolati erano ricombinanti. L'analisi di sequenza è stata eseguita ancora una volta, per confermare l'assenza di mutazioni nel gene in questione. Infine, le cellule di *E. coli* BL21 (DE3) Star, sono state trasformate con il plasmide pET-28(a)-tTG, per produrre la tTG di *Guinea pig* ricombinante.

3.2.1.6 La sovraespressione della gptTG ricombinante

Le cellule di *E. coli* BL21 (DE3) Star contenenti il plasmide d'espressione pET-28(a)-tTG sono state coltivate per una notte a 37 °C, in 50 ml di terreno liquido (LB) contenente 50 mg/ml Kan. Una porzione (20 ml) della sospensione batterica ottenuta è stata, quindi, inoculata in 400 ml di LB fresco e le cellule sono state successivamente incubate a 37 °C con agitazione (250 rpm). Quando la densità ottica (O.D.) della coltura cellulare, misurata a 600 nm, ha raggiunto 0.6 O.D., è stata indotta l'espressione dell'His6-tTG aggiungendo di 0.1-1 mM IPTG (isopropil β -D-1-tiogalattopiranoside), analogo del galattosio non metabolizzabile, usato per indurre l'espressione dei geni sotto il controllo dell'operone *Lac* in *E. coli*. La coltura cellulare è stata ulteriormente incubata per 3-15 ore a 37 °C, in agitazione a 240 giri/min.

- Metodo A: Espressione a bassa temperatura

Le cellule di *E. coli* BL21 (DE3) Star contenenti il plasmide d'espressione pET-28(a)-tTG sono state coltivate per una notte a 37 °C, in 50 ml di terreno LB +

50 mg/ml Kan. Una porzione (20 ml) della sospensione batterica è stata poi inoculata in 400 ml di terreno LB fresco e le cellule sono state incubate a 37 °C con agitazione (250 giri/min). L'induzione proteica è stata eseguita abbassando la temperatura a 20 °C.

- Metodo B: espressione con betaina (chaperone chimico)

Le cellule di *E. coli* BL21 (DE3) Star ospitanti il plasmide d'espressione pET-28(a)-tTG sono state coltivate durante la notte in 50 ml di terreno LB contenente 50 mg/ml Kan. Una porzione (20 ml) della sospensione batterica è stata quindi inoculata in 400 ml di LB fresco, contenente sorbitolo 1M e betaina 2.5 mM e coltivata a 28 °C, in agitazione a 240 giri/min. L'induzione dell'espressione dell'His6-tTG è stata procurata aggiungendo 0.1 mM IPTG.

3.2.1.7 Analisi delle proteine nel lisato batterico

Dopo l'induzione dell'espressione dell'His6-tTG, la sospensione batterica è stata centrifugata a 5000 giri/min per 30 minuti, a 4 °C. Il "pellet" cellulare è stato risospeso con 3 ml di buffer di estrazione (0.1 M tampone fosfato di potassio, pH 8.0, 5 mM imidazolo) per ogni grammo di "pellet", e successivamente incubato con (1 mg/ml) lisozima per 30 minuti a 37 °C. Le cellule sono state distrutte mediante ultrasuoni (tre impulsi di 200 W per 30 secondi con micro-punta conica). I detriti cellulari sono stati rimossi mediante centrifugazione (35.000 rpm per 45 min a 4 °C) ed il surnatante o estratto cellulare è stato utilizzato.

Per analizzare le proteine presenti nei corpi d'inclusione (aggregati proteici precipitati), sono stati utilizzati 200 µl di sospensione cellulare dal lisato totale. Due passaggi di centrifugazione (15 min, 13000 giri, a 4 °C) sono stati eseguiti per eliminare ogni traccia di surnatante. I detriti cellulare sono stati poi risospesi in 200 µl di buffer di estrazione. Infine, gli estratti cellulari e i detriti cellulari, con gli standard proteici sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica.

3.3 Elettroforesi: gel di poliacrilammide in condizioni riducenti e denaturanti

L'elettroforesi in condizioni riducenti e denaturanti (SDS-PAGE) è stata eseguita in una cella elettroforetica Bio-Rad, su gel discontinuo, in accordo con il metodo di Laemmli (1970). Per preparare il gel, dallo spessore di 0.75 mm, sono state

utilizzate soluzioni di acrilamide e bis-acrilamide (N,N'-metilene-bis-acrilamide), rispettivamente al 29.2% ed allo 0.8%. Il gel di separazione (lower) era costituito da una soluzione di poliacrilammide al 12%, mentre, lo strato superiore di gel (upper) era costituito da una soluzione di poliacrilammide al 4%. I campioni (10 µl), seguendo il protocollo di Laemmli, sono stati denaturati a 100 °C per 10 minuti dopo aggiunta di un tampone composto da: 50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 5% w/v β-mercaptoetanolo, 2% w/v SDS, 0.001% w/v blu di bromofenolo, 10% v/v glicerolo e caricati su gel negli appositi pozzetti. L'elettroforesi è stata condotta inizialmente a 80 Volt, per favorire l'entrata dei campioni nel gel, poi a 150 Volt costanti e infine è stata bloccata quando il blu di bromofenolo ha raggiunto (~ 1h) l'estremità inferiore del gel. Come marcatore dei diversi pesi molecolari, è stato utilizzato uno standard proteico a basso peso molecolare (97 kDa-14.4 kDa) (GE Healthcare). Dopo la corsa elettroforetica, allo scopo di fissare e colorare le proteine, i gel sono stati immersi in una soluzione di 0.1% Coomassie Brilliant-Blue R250, 25% metanolo, 10% acido acetico per 20-30 minuti. L'eccesso di colorante è stato allontanato mediante una serie di lavaggi con una soluzione contenente 30% v/v metanolo e 10% v/v acido acetico. Tutte le procedure sopra descritte sono state effettuate sotto costante agitazione, a temperatura ambiente. Infine, le immagini dei gel ottenuti sono state acquisite al GelDoc XR imager (Bio-Rad) e poi analizzate.

3.4 Determinazione della concentrazione proteica

Gli estratti cellulari dei ceppi di *E. coli* in cui è avvenuta l'induzione, sono stati sottoposti alla determinazione della concentrazione proteica attraverso il metodo di Bradford (Bradford M.M., 1976) usando il "Bio-Rad protein Assay". Come proteina di riferimento è stata utilizzata l'albumina di siero bovino (BSA) la cui concentrazione è stata determinata spettrofotometricamente assumendo che una soluzione allo 0.1% (peso/volume) abbia un assorbimento a 280 nm di 0.67 O.D.

3.5 Saggio enzimatico per la transglutaminasi (EC 2.3.2.13)

L'attività specifica dell'His6-gptTG è stata misurata mediante il saggio colorimetrico dell'idrossammato basato sul seguente principio di reazione:

$$\text{CBZ-Gln-Gly} + \text{Idrossilammina} \rightarrow \text{Transglutaminasi} \rightarrow \text{CBZ-Gln-Gly-Idrossammato}.$$

I reagenti utilizzati sono stati: A. 1 M tampone Tris, portato a pH 6.0 a 37 °C con Acido Acetico Glaciale; B. N-Carbobenzossi-Glutaminilglicina (CBZ-Gln-Gly); C. 200 mM Idrossilammina con 20 mM Glutazione in forma ridotta (HA/Glut); D. 1 M Soluzione Cloruro di Calcio (CaCl₂); E. 10 mM Soluzione di Acido L-Glutammico γ -Monoidrossammato (Std); F. 12% (v/v) Soluzione di Acido Tricloroacetico (TCA); G. 5% (w/v) Soluzione di Cloruro Ferrico (FeCl₃); H. 100 mM Acido cloridrico; I. Soluzione contenente 2 unità/ml di transglutaminasi (immediatamente prima dell'uso). Si è proceduto dunque, alla preparazione di una miscela di reazione mediante la combinazione dei seguenti reagenti: 120 mg di Reagente B, 2 ml di Reagente A, 5 ml di Reagente C, 0.05 ml di Reagente D (CaCl₂), portati a pH 6.0 a 37 °C con 100 mM NaOH. Infine, si è aggiunta acqua deionizzata fino a un volume finale di 10 ml. Poi, i seguenti reagenti (in ml), sono stati riuniti in eppendorf:

	<u>Test</u>	<u>Test Blank</u>	<u>Std.</u>	<u>Std.Blank</u>
Miscela di reazione	0.20	-----	-----	-----
Equilibrata a 37 °C				

Reagente I (Soluzione enzimatica)	0.03	-----	-----	-----
-----------------------------------	------	-------	-------	-------

mescolati per inversione e incubati a 37 °C per 10 minuti. Dopo di che sono stati aggiunti:

	<u>Test</u>	<u>Test Blank</u>	<u>Std.</u>	<u>Std.Blank</u>
Acqua deionizzata	-----	-----	-----	0.10
Miscela di reazione	-----	0.20	-----	-----
Reagente E (Std)	-----	-----	0.10	-----
Reagente F (TCA)	0.50	0.50	0.50	0.50
Reagente I (Soluzione enzimatica)	-----	0.03	-----	-----
Reagente G (FeCl ₃)	0.50	0.50	0.50	0.50

mescolati per inversione e centrifugati per 5 minuti. Le soluzioni di standard (Std.), campione (Test) e controlli (Test Blank e Std.Blank) sono state trasferite in cuvette di plastica e sottoposte a letture spettrofotometriche a 525 nm. I calcoli effettuati sono stati i seguenti:

$$- E_{mM}^1 = (A_{525nm} \text{ Std.} - A_{525nm} \text{ Std. Blank}) (1.1);$$

$$- \text{Unità/mg di enzima} = \frac{(A_{525nm} \text{ Test} - A_{525nm} \text{ Test Blank}) \times (1.23)}{(EmM) \times (\text{mg di enzima/RM}) \times (10)},$$

1.1= Volume dello Standard (in ml); 1.23= Volume della miscela colorata; RM= Miscela di Reazione (volume= 0.23 ml); 10= Tempo di reazione in minuti.

Un'unità di enzima ha catalizzato la formazione di 1.0 μ moles d'idrossammato per minuto dalla Na-CBZ-Glutaminil-glicina e dall'idrossilammina (Folk, J. E. and Cole, P. W., 1966).

3.6 Produzione e purificazione di anticorpi policlonali anti-gptTG

L'attività sperimentale ha previsto la produzione di anticorpi policlonali anti-gptTG in coniglio. Molto brevemente, i conigli sono stati immunizzati mediante iniezione intraperitoneale (i.p.) di un'emulsione composta da 50 μ l di preparazione commerciale di gptTG risospesa in acqua distillata (1 mg/ml) e 50 μ l di adiuvante completo di Freund (FCA). Dopo tre settimane i conigli sono stati sottoposti a richiamo mediante iniezione i.p. di un'emulsione di 50 μ l di gptTG e 50 μ l di adiuvante incompleto di Freund. I conigli sono stati quindi, dissanguati dopo due settimane; i sieri raccolti sono stati poi analizzati per il titolo anticorpale gptTG-specifico mediante ELISA. I sieri a titolo più elevato sono stati riuniti e sottoposti a purificazione della frazione IgG mediante cromatografia di affinità su resina "Protein A Fast Flow" (Amersham). Una colonna (1.0 x 2.0 cm) impaccata con 1.5 ml di resina è stata equilibrata con 9 ml di tampone di legame (20 mM sodio fosfato, pH 7.0); 300 μ l di campione, diluiti in 900 μ l di tampone di legame, sono stati quindi, applicati alla colonna e seguiti da una fase di lavaggio con 12 ml di tampone di legame al fine di eliminare i contaminanti. Infine, la frazione di IgG è stata eluita utilizzando tampone di eluizione (0.1 M Glicina, pH 3.0) e immediatamente neutralizzata mediante aggiunta di 1 M Tris/Cl pH 9.0 (1/10 vol). La preparazione di IgG così ottenuta è stata analizzata mediante SDS-PAGE. In seguito, il contenuto proteico della frazione IgG purificata è stato quindi, determinato in accordo con il metodo di Bradford (Bradford M.M., 1976).

3.7 Marcatura chimica della gptTG e degli Ab anti-gptTG con sonde fluorescenti

Le preparazioni commerciali di transglutaminasi tissutale da fegato di *Guinea pig* e gli anticorpi policlonali anti-transglutaminasi da coniglio sono stati rispettivamente marcati con il DyLight Fluor 594 e il DyLight Fluor 649 (Thermo Scientific, Pierce), due sonde fluorescenti ammino-reattive contenenti l'estere NHS (*N*-idrossisuccinimide), il gruppo reattivo più semplice e comunemente usato per la marcatura delle proteine. Il DyLight Fluor 594 (λ_{EX} : 593 nm; λ_{EM} : 618 nm) e il DyLight Fluor 649 (λ_{EX} : 646 nm; λ_{EM} : 674 nm) reagiscono con i gruppi amminici alifatici non protonati, includendo le estremità ammino-terminali delle proteine e i gruppi ϵ -amminici delle lisine. Poiché i gruppi ϵ -amminici delle lisine hanno un pKa di circa 10.5, al fine di mantenere quest'ammino-gruppo in una forma non protonata, la marcatura chimica della gptTG e degli Ab anti-tTG da coniglio è stata eseguita usando come tampone di reazione il: 0.1 M sodio-fosfato, 0.15 M NaCl, a pH 7.2-7.5. La gptTG e le IgG policlonali sono state, quindi, diluite in 1.0 ml di tampone di reazione a 2 mg/ml e i fluorofori DyLight Fluor 594 e 649 sono stati disciolti in DMF (Dimetilformammide) immediatamente prima di dare inizio alla reazione, utilizzando un eccesso di 10 moli di reagenti per ogni mole di proteina. La marcatura è stata eseguita seguendo il protocollo fornito dalla Thermo Scientific, Pierce. In seguito, l'Ag e gli Ab marcati sono stati facilmente separati dalla porzione di fluoroforo che non ha reagito con essi, usando opportuni filtri da centrifuga (Millipore's Amicon Ultra-0.5) e tampone PBS 1 X, come soluzione di lavaggio. Tutte le procedure di centrifugazione sono state eseguite a 4 °C. L'efficienza di marcatura dei campioni ottenuti è stata calcolata spettrofotometricamente, utilizzando una cuvetta di quarzo dal cammino ottico di 1 cm e misurando l'assorbanza (A) a 280 nm e l'A_{max} dello specifico fluoroforo mediante l'applicazione delle seguenti formule: Moli di fluoroforo per moli di proteina = $\frac{A_{max} \text{ della proteina marcata}}{\epsilon \text{ fluoroforo} \times \text{concentrazione proteica (M)}} \times \text{fattore di diluizione}$.

3.8 Strumentazione

Tutte le misure spettrofotometriche eseguite finora sono state registrate utilizzando lo spettrofotometro Cary 50 Bio UV/Vis (Varian).

Le centrifugazioni sono state eseguite mediante Eppendorf Centrifuge 5810R; Eppendorf 5415D; Sorvall RS5C Dupont; Beckman LE-80 ultracentrifuge.

3.9 Studi di Spettroscopia di Fluorescenza

3.9.1 Misure di fluorescenza statica e applicazione del fenomeno “FRET”

Misure di fluorescenza in stadio-stazionario (steady-state) sono state eseguite al fine di rilevare le interazioni tra la gptTG e gli Ab anti-tTG, rispettivamente marcati con una coppia di fluorofori donatore/accettore. Per far ciò è stato sfruttato il principio della FRET, fenomeno elettrodinamico ampiamente usato per lo studio di reazioni di bioaffinità. Il trasferimento di energia di risonanza a fluorescenza avviene tra una molecola donatore (D) che si trova nello stato eccitato, grazie ad irraggiamento con luce laser a una data lunghezza d'onda, e una molecola accettore (A) che invece si trova nello stato fondamentale, quindi non eccitato. In tale fenomeno non avviene trasferimento di fotoni, ma il D e l'A sono accoppiati mediante interazioni dipolo-dipolo. Le molecole di donatore, di solito, presentano spettri di emissione di lunghezze d'onda minori che si sovrappongono con gli spettri di assorbimento delle molecole di accettore. L'energia di trasferimento è determinata per lo più da due fattori: la distanza tra il donatore e l'accettore e la sovrapposizione dei rispettivi spettri di emissione del donatore e di assorbimento dell'accettore. Per convenzione la sovrapposizione spettrale è descritta in termini di distanza di Förster (R_0) che tipicamente varia tra i 20 e i 60 Å, in relazione alla taglia delle macromolecole biologiche. Essa non è altro che la distanza alla quale si verifica il 50% di trasferimento di energia tra la coppia donatore/accettore. Il rapporto di energia di trasferimento $k_T(r)$ dal donatore all'accettore è dato dunque da: $k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6$, dove r è la distanza tra il donatore (D) e l'accettore (A) e τ_D è il tempo di vita (lifetime) del donatore in assenza di energia di trasferimento (Joseph R. Lakowicz, *"Principles of Fluorescence Spectroscopy"*, III edizione, 2006) (Figura 19).

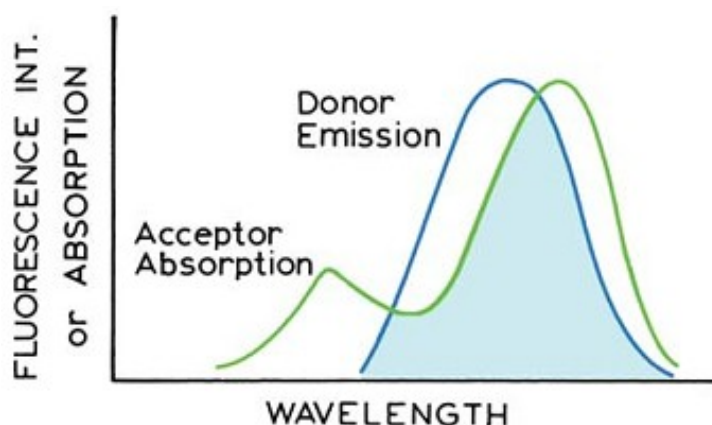


Figura 19. Esempio di sovrapposizione spettrale per il verificarsi di FRET

Misure di FRET in stadio stazionario sono state eseguite per studiare le interazioni tra Ag e Ab, individualmente marcati con molecole di D e A.

Il segnale fluorescente dei campioni in esame è stato misurato, con illuminazione costante, in funzione della lunghezza d'onda di emissione, utilizzando un'adatta lunghezza d'onda d'eccitazione e considerando un appropriato intervallo di emissione, in modo tale da poter registrare l'area sottesa alle rispettive curve di emissione di fluorescenza. Gli spettri di emissione della gptTG-DyLight 594 e degli Ab anti-tTG-DyLight 649 sono stati, quindi, registrati alla lunghezza d'onda di eccitazione (λ_{EX}) di 530 nm e l'intervallo di emissione considerato andava dai 550 nm ai 750 nm. Prima di compiere le misure, i campioni sono stati tenuti a 25 °C per 5 minuti in un supporto termostatato. Al fine di evitare gli "inner filter effects", tutti i campioni sono stati diluiti fino al raggiungimento di un'assorbanza a 530 nm che fosse al di sotto di 0.1 O.D. La gptTG-DyLight 594 (0.53 μ M) è stata incubata con concentrazioni crescenti di Ab anti-tTG-DyLight 649 (in eccesso molare di 1 a 4 volte) per 5-10 minuti a temperatura ambiente prima di registrare i rispettivi spettri di fluorescenza. Ciascuna misura è stata ripetuta per almeno tre volte e gli spettri così ottenuti sono stati sovrapposti. L'acquisizione e l'analisi dei dati sono state eseguite usando lo spettrofotometro Cary 50 Bio (Varian Inc. Australia) per gli studi di assorbimento e lo spettrofotometro a fluorescenza Cary Eclipse (Varian Inc., Australia) per le misure di fluorescenza statica. L'assorbimento e l'emissione dei campioni sono stati misurati a temperatura

ambiente usando cuvette di quarzo dal cammino ottico di 1 cm x 0.4 cm, ed il volume di campione utilizzato per ciascun'osservazione è stato di 1 ml.

3.9.2 Misure di fluorescenza risolta nel tempo

Le misure di fluorescenza risolta nel tempo contengono molte più informazioni molecolari di quelle ottenibili dalle osservazioni di fluorescenza statica. Uno dei metodi per misurare la fluorescenza risolta nel tempo è il cosiddetto "time-domain" o fluorimetria a impulso che comporta l'esposizione del campione in esame a un impulso di luce, la cui durata è tipicamente più piccola del suo tempo di decadimento (τ) o "lifetime". Il "lifetime" non è altro che la media della quantità di tempo in cui un fluoroforo resta nello stato eccitato, in seguito ad eccitazione, per poi ritornare allo stato fondamentale. Esso è calcolato dalla seguente formula:

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}}, \text{ dove } \Gamma \text{ è la velocità di emissione del fluoroforo e } k_{nr} \text{ è la sua velocità}$$

di decadimento non-radiativo allo stato fondamentale S_0 . Questa intensità di decadimento è registrata con un sistema di rilevamento ad alta velocità che permette di misurare l'intensità nell'ordine dei nanosecondi. Anche il trasferimento di energia di risonanza (RET) è meglio studiato, usando le misure di fluorescenza risolta nel tempo. Infatti, con questo tipo di misure è possibile distinguere diverse subpopolazioni di molecole eccitate, che sono invece indiscernibili mediante osservazioni di fluorescenza statica. In presenza di energia di trasferimento, i decadimenti dell'intensità di fluorescenza rivelano come le molecole di accettore sono distribuite nello spazio intorno alle molecole di donatore. Inoltre, lo studio del decadimento del donatore risolto nel tempo, è molto informativo circa la purezza del campione così come della distanza donatore-accettore (Joseph R. Lakowicz, *"Principles of Fluorescence Spectroscopy"*, III edizione, 2006).

Misure di fluorescenza risolta nel tempo sono state quindi, eseguite, al fine di studiare la natura del decremento della fluorescenza osservato negli esperimenti di fluorescenza statica. Perciò, i campioni preparati nello stesso modo descritto in precedenza, sono stati sottoposti a misure di lifetime mediante l'utilizzo di un fluorimetro FluoTime200 (PicoQuant, GmbH). Questo strumento è fornito di una piastra microcanale ultra veloce (MPT) ed è capace di risolvere decadimenti al di sotto dei nanosecondi. Il laser LDH-PC-405 (PicoQuant, GmbH) rilasciava impulsi

a 470 nm ed era programmato a basso regime (4 ps FWHM) con ripetizioni dalla velocità di 10 MHz. I laser abitualmente utilizzati per misurare i decadimenti di fluorescenza e i lifetime presentano un'accuratezza di ± 10 picosecondi. I dati di "lifetime" sono stati analizzati dal FluoTime Software, Version 4.0 (PicoQuant, GmbH). Per le misure di "lifetime", è stato usato un monocromatore supportato da un filtro "long wave pass". Tutte le misure per il decadimento della fluorescenza risolta nel tempo sono state eseguite usando condizioni di "magic angle". I dati di decadimento dell'intensità sono stati analizzati da un software della "Vinci" usando un modello multi esponenziale: $I(t) = \sum_i \alpha_i \exp(-t/\tau_i)$, dove $I(t)$ è l'intensità a un tempo t , α_i è l'ampiezza della componente i e τ_i è il "lifetime" della componente i .

3.10 Configurazione "front-face"

L'utilizzo della configurazione "front-face", che prevede l'immobilizzazione del campione su supporto solido, prima di eseguire le misure di fluorescenza è stato preferito al fine di ridurre gli effetti del "Raman scattering" causati dall'acqua presente nelle soluzioni in esame. Infatti, l'alta densità ottica delle soluzioni permette una piccola penetrazione della luce di eccitazione nel campione esaminato, riducendo dunque la diffusione prodotta (Gryczynski Z. & Bucci E., 1993). È anche molto importante notare che, in soluzione, la dinamica delle interazioni Ag-Ab cambia, comportando un cambiamento dei valori di FRET nel momento in cui tali molecole sono marcate con una coppia donatore/accettore. In aggiunta, anche la natura policlonale degli anticorpi induce delle variazioni nel rapporto stechiometrico tra Ag-Ab in soluzione, quindi, al fine di evitare tali conseguenze, si è pensato di immobilizzare i complessi Ag-Ab su lastre di vetro, per poi proseguire all'acquisizione degli spettri di fluorescenza in configurazione front-face.

3.10.1 Immobilizzazione di gptTG e Ab anti-gptTG su vetrino

Lastrine di vetro (22 mm x 22 mm) sono state ricoperte rispettivamente con gptTG-DyLight 594 e Ab anti-tTG-DyLight 649, sfruttando interazioni di tipo non covalente. Prima di ciò, i vetrini sono stati accuratamente puliti, per poi essere ricoperti con nastro adesivo contenente dei buchi, al fine di formare dei pozzetti

sulla superficie, dove sono stati aggiunti 50 μ L di soluzione di poli-L-Lisina (0.1% poli-L-Lisina w/v, in H₂O Milli-Q), incubati a temperatura ambiente per mezz'ora e risciacquati con H₂O Milli-Q (Figura 20).

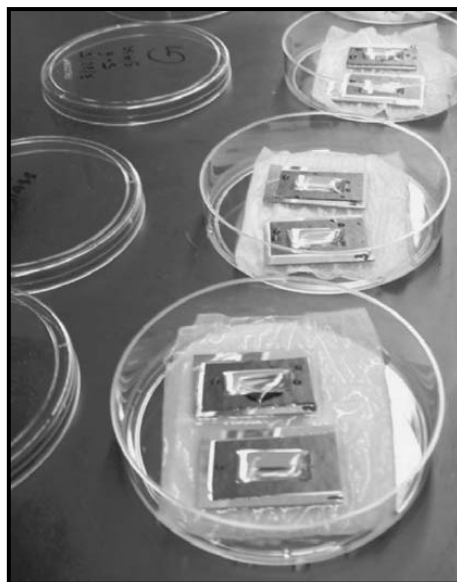


Figura 20. Vetrini ricoperti di nastro adesivo (formante dei pozzetti) prima dell'incubazione in camera umida.

Le soluzioni di gptTG-DyLight 594 e Ab anti-tTG-DyLight 649 da immobilizzare (diluite a 100 μ g/ml in tampone sodio-fosfato, 50 mM, pH 7.4), sono state aggiunte sulla superficie dei vetrini (50 μ L/pozzetto), e lasciate incubare a temperatura ambiente in camera umida per tutta la notte, per poi essere risciacquate con H₂O Milli-Q e soluzione 0.05% Tween-20, ripetutamente. Il bloccaggio dei siti aspecifici è stato ottenuto aggiungendo una soluzione di bloccaggio (1% BSA, 1% saccarosio, 0.05% NaN₃, and 0.05% Tween-20 in 50 mM tampone Tris-HCl, pH 7.4, 50 μ L/pozzetto), lasciata a incubare per tutta la notte a 4 °C in camera umida. Le lastrine sono state quindi, risciacquate con H₂O Milli-Q e soluzione 0.05% Tween-20, ripetutamente. I pozzetti sono stati ricoperti dunque, con tampone sodio-fosfato 50 mM, pH 7.4. Vetrini coprioggetto sono stati poi montati sulle preparazioni e i campioni sono stati usati per compiere le misure di fluorescenza. La seconda parte dell'esperimento ha previsto l'aggiunta di Ab anti-tTG-DyLight 649 (diluiti a 100 μ g/ml in tampone sodio-fosfato 50 mM,

pH 7.4) sul vetrino ricoperto da gptTG-DyLight 594 e di gptTG-DyLight 594 (diluata a 100 ug/ml in tampone sodio-fosfato 50 mM, pH 7.4) sul vetrino ricoperto da Ab anti-tTG-DyLight 649 (50 µl/pozzetto). Le lastrine così preparate sono state incubate per tutta la notte in camera umida. Dopo di che sono state sciacquate con H₂O Milli-Q e soluzione 0.05% Tween-20, ripetutamente (Matveeva E. et al., 2004). Ricoperte di soluzione di bloccaggio e vetrini coprioggetto, le preparazioni sono state sottoposte a misure di fluorescenza utilizzando lo spettrofluorimetro PC1 Photon Counting (ISS, Champaign, Illinois). I laser usati hanno eccitato le preparazioni così ottenute a lunghezze d'onda di 530 nm e 635 nm e i filtri applicati di fronte al "detector" sono stati di 550 nm e 650 nm longpass.

3.11 Determinazione di Singola Molecola basata sul principio della Microscopia a Fluorescenza

La Determinazione di Singola Molecola (SMD), mediante l'utilizzo dei principi della fluorescenza, rappresenta il massimo livello di sensibilità raggiunto dai metodi analitici. Con questo tipo di tecnologia, gli spettri di emissione di una singola molecola presente in una miscela di reazione saranno rappresentativi di solo quel tipo di molecola, e non di una media di spettri appartenenti a differenti molecole.

Tra i diversi metodi di rilevamento di singola molecola, c'è la Spettroscopia di Correlazione di Fluorescenza (FCS), che misura le fluttuazioni di molecole fluorescenti che diffondono liberamente in un'area specifica, attraversata da un raggio di luce focalizzata. Altri metodi per la SMD sono basati sull'acquisizione d'immagini ottiche, sfruttando i principi della microscopia uniti a quelli della fluorescenza (FLIM: Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy). Tali studi sono per lo più eseguiti su campi di osservazione ristretti e richiedono l'immobilizzazione delle molecole fluorescenti su supporti solidi (Joseph R. Lakowicz, *"Principles of Fluorescence Spectroscopy"*, III edizione, 2006).

3.11.1 Spettroscopia di Correlazione di Fluorescenza

La FCS non richiede una superficie d'immobilizzazione e può essere eseguita su molecole in soluzione. Essa si basa sull'analisi delle intensità di fluttuazione delle molecole fluorescenti nel tempo, risultato di alcuni processi di diffusione

traslazionale all'interno o all'esterno di un piccolo volume di campione, di circa un femtolitro, definito da un raggio laser focalizzato e da un'apertura confocale. Quando il fluoroforo diffonde nel raggio di luce focalizzata, si verifica un'accelerazione dei fotoni emessi, dovuta a molteplici cicli di eccitazione-emissione. Se il fluoroforo diffonde rapidamente al di fuori del volume irraggiato, l'accelerazione fotonica è breve, viceversa se il fluoroforo diffonde più lentamente, l'accelerazione fotonica è di più lunga durata. Mediante analisi di correlazione dell'emissione in funzione del tempo, è possibile dunque, determinare il coefficiente di diffusione del fluoroforo. Tale tecnologia è stata utilizzata per studiare le interazioni tra tTG-DyLight 594 e Ab anti-tTG-DyLight 649. Per i campioni analizzati, sono state richieste concentrazioni molecolari dell'ordine delle pico- e nanomoli, poiché più alte concentrazioni avrebbero generato più piccole fluttuazioni e quindi alterazioni nei risultati. Variazioni nelle fluttuazioni potevano essere generate anche dal cambiamento del numero di fluorofori nel volume di osservazione dovuto alla diffusione, oppure dal cambiamento delle proprietà di fluorescenza delle molecole in conseguenza a reazioni chimiche o a fluttuazioni conformazionali. Diverse equazioni dunque, sono state necessarie per descrivere ciascun processo o due o più processi che hanno influenzato contemporaneamente gli stessi dati. Le intensità di fluttuazioni verificatesi nel tempo (amplitudine e velocità) all'interno del volume osservato, sono state usate per determinare la funzione di autocorrelazione. Tale funzione, normalizzata dall'intensità quadratica media, è data da: $G'(\tau) = \frac{\langle F(t) F(t + \tau) \rangle}{\langle F \rangle \langle F \rangle}$, dove $F(t)$ è l'intensità di fluorescenza al tempo t e $F(t+\tau)$ è l'intensità di fluorescenza dopo un ritardo di tempo τ . L'altezza e la posizione della curva di correlazione sull'asse del tempo hanno determinato la media del numero di fluorofori ed il loro coefficiente di diffusione (Joseph R. Lakowicz, *"Principles of Fluorescence Spectroscopy"*, III edizione, 2006) (Figura 21).

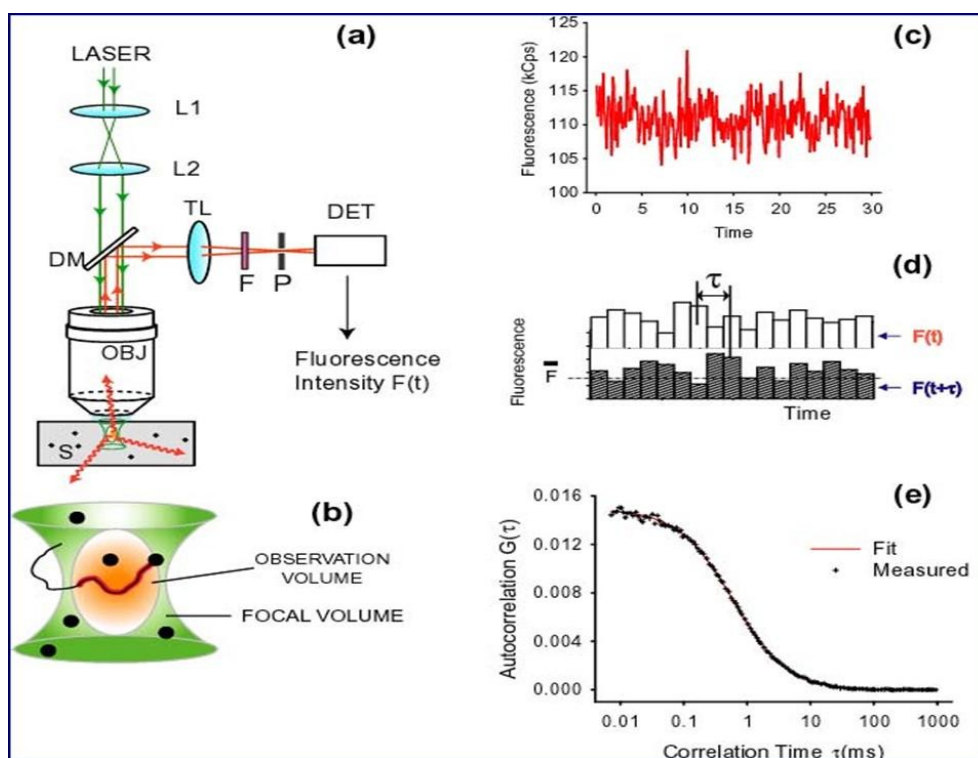


Figura 21. Spettroscopia di correlazione a fluorescenza; (a): Tipica strumentazione per FCS; (b): Volume osservato; (c)/(d): Intensità di fluttuazioni nel tempo; (e): Funzione di correlazione.

Le misure di FCS sono state eseguite a temperatura ambiente utilizzando un microscopio confocale (MicroTime 200, PicoQuant, Germany) equipaggiato con un obiettivo 100X a olio-immersione (Olympus UPlanFL N 100), ad alta apertura numerica ($NA = 1.3$). Come fonte di eccitazione è stato impiegato un setup confocale illuminato da un diodo laser pulsato dalla lunghezza d'onda di 470nm, i cui impulsi luminosi avevano una velocità di ripetizione di 20 MHz, utilizzando un'eccitazione a singolo fotone e una porta laser sincronizzata in un canale di rilevamento. Le osservazioni sono state effettuate utilizzando i filtri 583/120 band pass (Semrock) e rilevate mediante l'utilizzo di un fotodiodo come detector operante in modalità di conta a singolo fotone (PerkinElmer, SPCE-AQR-14), con un'integrazione di pixel pari a 0.6 ms. Le osservazioni, inoltre, sono state eseguite con un'intensità di luce di circa $8 \mu W$. I tempi e i coefficienti di diffusione sono stati registrati sia per la gptTG marcata con il DyLight 594 in soluzione, sia in presenza degli Ab anti-tTG-DyLight 649. Le concentrazioni dei campioni utilizzati erano

pari a 15 nM per il donatore e 1 nM per l'accettore. Gli spettri sono stati registrati in funzione del tempo (5 min ognuno) e i tempi di diffusione sono stati determinati dall'autocorrelazione delle fluttuazioni di fluorescenza, che sono state analizzate utilizzando un software della PicoQuant, Inc.

3.11.2 “FRET” a livello di singola molecola

La SMD diventa un'applicazione molto più efficiente quando combinata con il trasferimento di energia di risonanza (smFRET). L'esperimento da noi eseguito ha previsto la misurazione degli spettri di emissione e del “lifetime” di una miscela di molecole proteiche composta dall'antigene gptTG marcato con il donatore DyLight 594 (15 nM) e dagli Ab anti-tTG marcati con il fluoroforo accettore DyLight 649 (1 nM) che si andavano a legare ad alcune molecole di antigene marcato. Sia le molecole di donatore che quelle di accettore sono state eccitate utilizzando degli impulsi di luce provenienti da due laser a picosecondi, aventi lunghezze d'onda differenti, ovvero 470 nm per eccitare il donatore e 635 nm per eccitare l'accettore. Quando vengono usati due laser, essi non funzionano in contemporanea, ma in maniera alternata e per piccoli periodi di tempo. Questo tipo di eccitazione è conosciuta con il nome di PIE (Pulsed-Interleaved Excitation), ovvero eccitazione interlasciata ad impulsi. Dopo che il campione è stato eccitato, le emissioni dalle singole molecole di donatore e di accettore sono state raccolte come traiettorie di singole molecole (Figura 22), utilizzando una camera CCD (charge coupled device) e dei detector a specifico fotodiodo (APD).

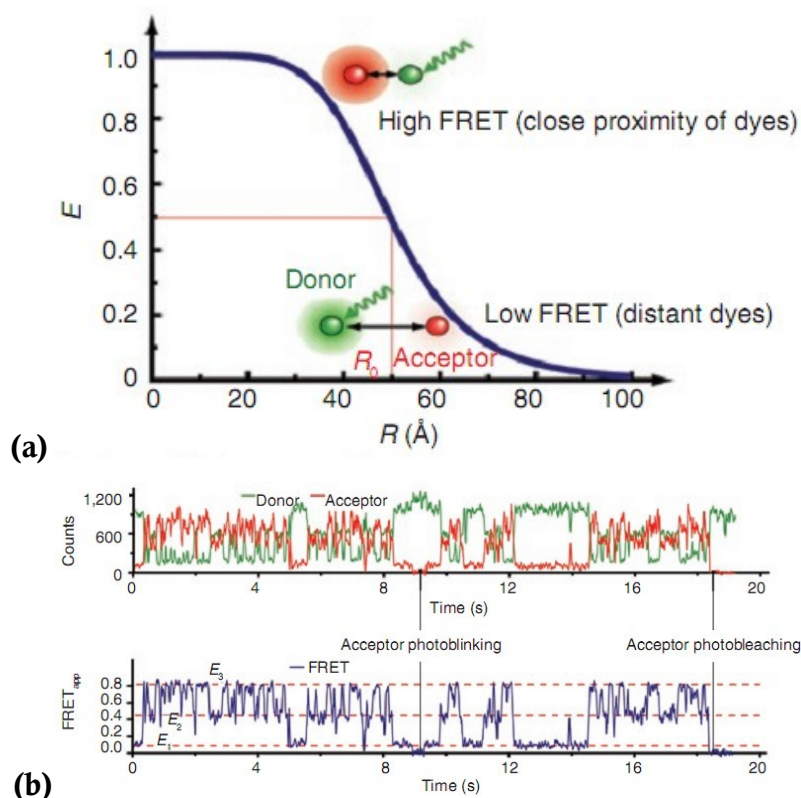


Figura 22. Descrizione della SmFRET. (a): Efficienza di FRET (E) in funzione della distanza tra i fluorofori (R) per un $R_0 = 50$ Å. Per $R = R_0$, $E = 0.5$, ma a distanze minori, $E > 0.5$ e viceversa. (b): Dati di FRET a due colori; pannello superiore: intensità del donatore-accettore; pannello inferiore: efficienza di FRET apparente calcolata dalle intensità del donatore-accettore mostrate sopra (Roy R. et al, Nature Methods, June 2008).

Speciali ottiche confocali sono state richieste per questo tipo di esperimento in smFRET. Una schematizzazione della spettroscopia usata per la smFRET è mostrata di seguito (Figura 23).

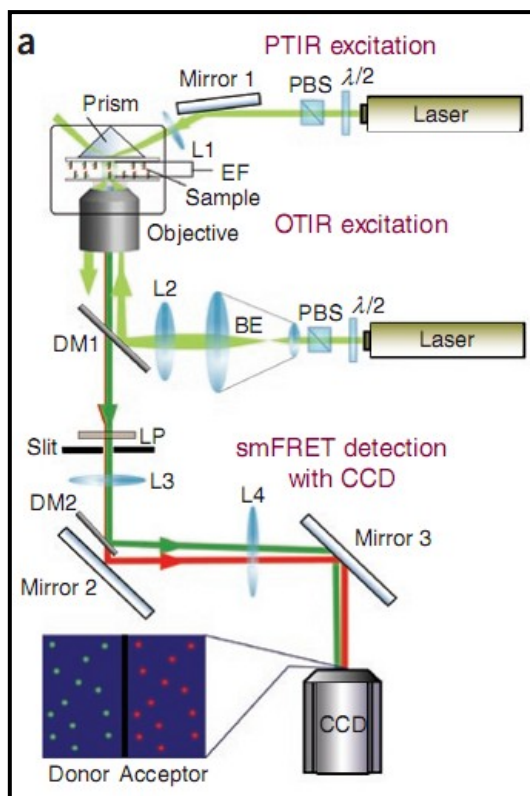


Figura 23. Spettroscopia schematica per la smFRET. Le singole molecole sono state eccitate dai laser PTIR e OTIR. La fluorescenza emessa è stata raccolta da un obiettivo. L'immagine mostrata divide le emissioni del D da quelle dell'A ed è stata acquisita lato per lato da una CCD camera (from Roy, R et al, Nature Methods, June 2008).

La reale efficienza di FRET è stata calcolata mediante la determinazione: di uno scambio di segnali tra i due canali, quello del donatore e quello dell'accettore, della differenza nella resa quantica e dell'efficienza tra le molecole di donatore e accettore. Quindi, la reale efficienza di FRET è stata data da: $E = (1 + \frac{ID}{IA - \chi ID} \gamma)^{-1}$, dove ID e IA sono le intensità del donatore e dell'accettore, rispettivamente con eccitazione del donatore; χ è l'interscambio del donatore nel canale dell'accettore e γ rende conto della differenza nella resa quantica e della rilevazione dell'efficienza tra le molecole di donatore e accettore.

Negli esperimenti da noi effettuati, l'eccitazione diretta dell'accettore ha portato alla determinazione della fluorescenza dei fotoni solo nel canale dell'accettore, laddove l'eccitazione del donatore ha portato alla determinazione della fluorescenza in entrambi i canali dell'accettore e del donatore. I fotoni provenienti dall'eccitazione sia del donatore sia dell'accettore sono stati separati per intervallo temporale basato sul tempo di arrivo dei loro fotoni. Tale principio prende il nome di TCSPC (Time-Correlated Single Photon Counting), ovvero, conta dei singoli fotoni correlata nel tempo (Figura 24).

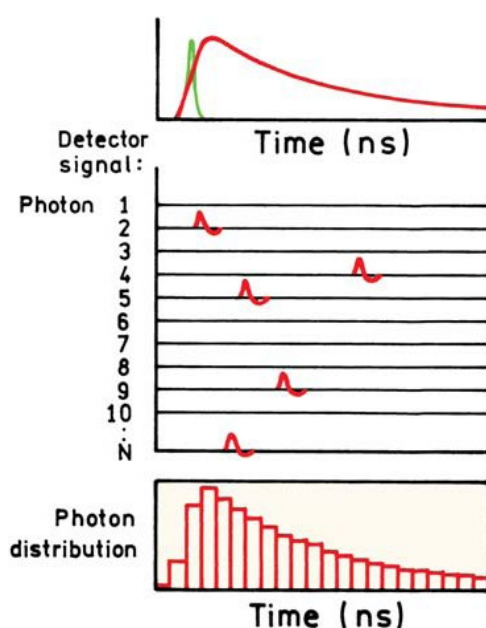


Figura 24. Principio della TCSPC. Gli impulsi mostrati nel pannello centrale rappresentano il prodotto di una frazione costante di discriminazione.

Il campione è stato eccitato con un impulso di luce, risultante in una lunghezza d'onda (come mostrato in alto in Figura 24), che per la TCSPC non corrisponde alla lunghezza d'onda generata quando molti fluorofori eccitati emettono numerosi fotoni che sono poi osservati. Infatti, applicando tale principio, per un impulso di laser è rilevato solo il primo fotone emesso. La velocità di rilevazione è stata di un fotone per 100 impulsi d'eccitazione. L'intervallo di tempo misurato tra l'impulso di eccitazione e l'osservazione del fotone è stato successivamente immagazzinato in

un istogramma, in cui l'asse x è rappresentato dalla differenza di tempo e l'asse y dal numero di fotoni rilevati in questa differenza di tempo.

3.11.3 Aumento di fluorescenza in presenza di particelle metalliche

È stato dimostrato che l'utilizzo di superfici planari costituite da metalli nobili va ad alterare le proprietà spettrali dei fluorofori, aumentando la loro emissione di fluorescenza. Tale approccio dunque, è stato usato per migliorare l'intensità di fluorescenza e la fotostabilità delle molecole fluorescenti coniugate ai campioni biologici in esame, aumentando quindi la sensibilità della tecnica di SMD. Queste alterazioni delle proprietà dei fluorofori, in presenza di particelle metalliche, sono dovute all'interazione delle molecole fluorescenti con le particelle metalliche vicine. In particolare, un fluoroforo allo stato eccitato assume le proprietà di dipolo oscillante che in vicinanza di particelle metalliche induce oscillazioni degli elettroni presenti in esse. Il campo elettrico creato dalla superficie metallica interagisce con il fluoroforo eccitato alterandone la sua emissione. Questo tipo d'interazione è per lo più bidirezionale, cosicché le oscillazioni indotte dalla luce nei metalli, hanno influenzato le proprietà spettrali dei fluorofori in esame, aumentandone l'eccitazione (in conseguenza al forte campo elettromagnetico), l'emissione di fluorescenza, la distanza di Förster e diminuendone il lifetime. Questi effetti prendono il nome di MEF (Metal-Enhanced Fluorescence), ovvero, fluorescenza aumentata dai metalli (Joseph R. Lakowicz, *"Principles of Fluorescence Spectroscopy"*, III edizione, 2006) (Figura 25).

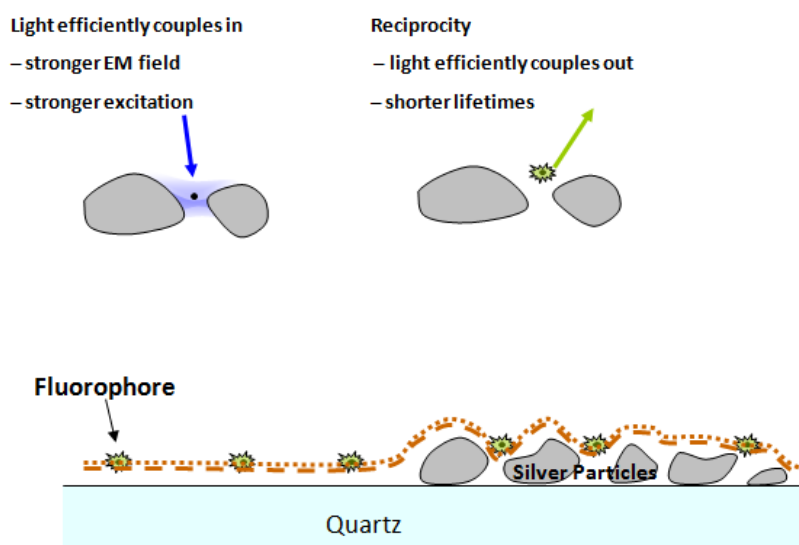


Figura 25. Schematizzazione degli effetti delle particelle di argento sui fluorofori (da: Principles of Fluorescence Spectroscopy, II edizione, 1999).

Al fine di migliorare la registrazione dei segnali di fluorescenza derivanti dallo studio delle singole molecole, sono stati quindi analizzati l'intensità di fluorescenza e il "lifetime" della gptTG-DyLight 594 (1 nM/5 pM), immobilizzata su lastrine di vetro presentanti nanostrutture d'argento ramificate (fractal-like structures), prima e dopo aggiunta degli Ab anti-tTG-DyLight 649 (5 pM).

3.11.3.1 Crescita elettrochimica di nanostrutture d'argento ramificate

Le strutture ramificate d'argento presenti sulle lastrine di vetro utilizzate per immobilizzare i campioni biologici sono state fabbricate utilizzando il seguente metodo (Shtoyko T. et al., 2008). Brevemente, due vetrini da microscopio sono stati accuratamente lavati con sapone Alconox, asciugati con isopropanolo, risciacquati con acqua bidistillata e incubati in 10^{-4} M cloruro di stagno (II) per poche ore. Dopo di che, due piccoli fogli d'argento (25 mm × 30 mm × 1 mm ognuno) sono stati inseriti, in uno spessore di 25 mm, tra i due vetrini tenuti adesi da nastro adesivo, come mostrato in Figura 26 (a). Lo spessore tra le due lastre è stato poi, riempito con acqua deionizzata. Una corrente diretta di 100 μ A è stata indotta tra gli elettrodi posti alle estremità dei due fogli d'argento in modo tale che le strutture

ramificate in argento cominciassero a crescere sul vetro andando dal catodo verso l'anodo come mostrato in Figura 26 (a). Il processo è stato portato avanti per 20 minuti, fino a quando le ramificazioni d'argento non risultavano visibili ad occhio nudo (Figura 26 (b)). Le nanostrutture d'argento così ottenute, sono state lasciate ad asciugare per tutta la notte. La struttura a "sandwich" è stata dunque, disassemblata e il vetrino inferiore con le ramificazioni d'argento ben adese a esso è stato conservato asciutto in capsula Petri fino al momento dell'uso.

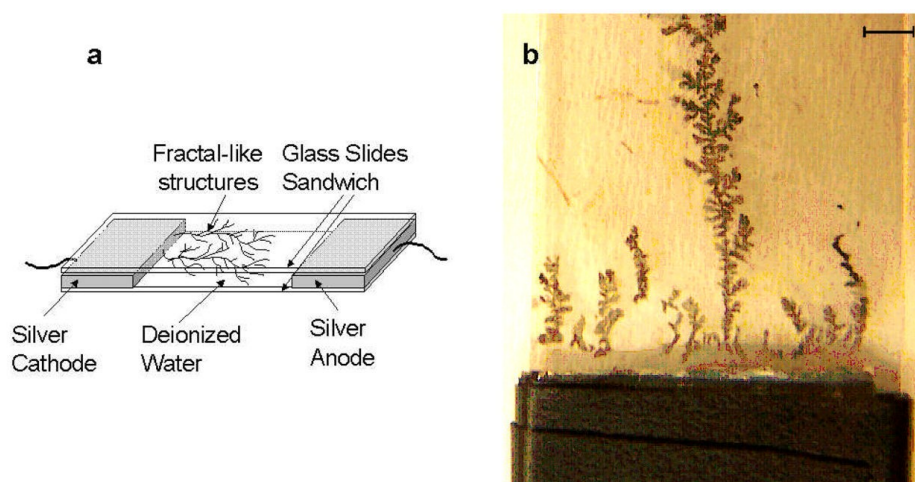


Figura 26. (a): Il sandwich realizzato per la crescita elettrochimica delle strutture d'argento ramificate su vetrino. (b) Fotografia di un vetrino con nanostrutture d'argento ramificate. La barra in alto è di 6 mm in lunghezza (Tanya Shtoyko et al., 2008).

3.11.4 Misure di Microscopia Confocale

Prima di compiere le misure di fluorescenza, i campioni sono stati opportunamente immobilizzati sui vetrini presentanti le nanostrutture d'argento ramificate, secondo il protocollo d'immobilizzazione descritto in precedenza. Le misure di fluorescenza sulle singole molecole sono state eseguite a temperatura ambiente usando il microscopio confocale MicroTime 200 (PicoQuant, Germany) equipaggiato con obiettivo a olio-immersione (Olympus UPlanFL N 100), ad alta apertura numerica (NA= 1.3). La gptTG-DyLight 594 concentrata 1 nM è stata eccitata a 470 nm. L'osservazione è stata realizzata utilizzando i seguenti filtri: 500 longpass, 488 RazorEdge (Semrock) e glass 530 longwavelength pass. In un secondo momento,

sono stati misurati l'intensità di fluorescenza e il "lifetime" della gptTG-DyLight 594 concentrata 5 pM con aggiunta degli Ab anti-tTG-DyLight 649 a una lunghezza d'onda di eccitazione di 470 nm. L'emissione di fluorescenza per il donatore è stata ricavata utilizzando i filtri: 500 longwavelength pass e 583/120 bandpass (Semrock), invece, quella per l'accettore con i filtri 647 longpass and 650 longpass. Tutte le osservazioni sono state eseguite con un'intensità di luce pari o al di sotto degli 0.4 μ W.

3.11.4.1 Microscopia a Immagini basata sulla Fluorescenza risolta nel tempo

Il trasferimento di energia di risonanza rivela la prossimità delle molecole di donatore a quelle di accettore, mediante cambiamento del lifetime del donatore. La determinazione dell'esistenza di legame tra Ag-Ab è stata più diretta misurando il lifetime del donatore, che sarebbe diminuito in seguito alla FRET verificatasi per l'avvenuto legame con l'accettore. È stato, quindi, possibile acquisire, con l'ausilio della microscopia confocale a scansione, immagini di lifetime, per una data area del campione selezionata (30 x 30 μ M). Tale tecnologia prende il nome di FLIM e ha previsto l'acquisizione d'immagini d'intensità di fluorescenza per la gptTG-DyLight 594 concentrata 1 nM e immobilizzata sui vetrini preparati con le nanostrutture d'argento ramificate e immagini di lifetime in SMD per la gptTG-DyLight 594 concentrata 5 pM, immobilizzata sugli stessi supporti ma in presenza di Ab anti-tTG-DyLight 649.

Capitolo IV

RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Produzione della gptTG ricombinante in *Escherichia coli*

Uno degli scopi principali di tale lavoro di ricerca è stato quello di stabilire un efficiente sistema di espressione della proteina transglutaminasi da fegato di *Guinea pig* ricombinante, in un ceppo batterico di *Escherichia coli*. Il vettore di espressione pET-28(a) basato sul promotore T7 della RNA polimerasi è stato scelto al fine di combinare la natura pratica di una coda esaistidinica, inserita all'estremità N-terminale della proteina, con il miglioramento della produzione di enzima solubile, al fine di ottenere dunque, discrete quantità di enzima in forma solubile con attività specifica paragonabile a quella dell'enzima nativo altamente purificato. Inoltre, la presenza della coda esaistidinica all'estremità ammino-terminale della proteina può dare la possibilità di utilizzare una rapida strategia di purificazione basata su cromatografia d'affinità che prevede l'immobilizzazione di ioni-metallici (IMAC) sulla resina d'interesse (Ni-NTA). Tuttavia, tale coda amminoacidica può essere rimossa mediante digestione proteolitica, poiché la sequenza di riconoscimento dell'enzima trombina è localizzata immediatamente a monte dell'estremità N-terminale della sequenza proteica della gptTG (Figure 27-28). I siti di clonaggio inseriti alle estremità N-terminale e C-terminale del gene della gptTG per le endonucleasi NdeI e XhoI sono stati opportunamente scelti, perché tali enzimi di restrizione non riconoscono nessuna sequenza di taglio all'interno del cDNA della gptTG garantendone così, l'integrità di sequenza.

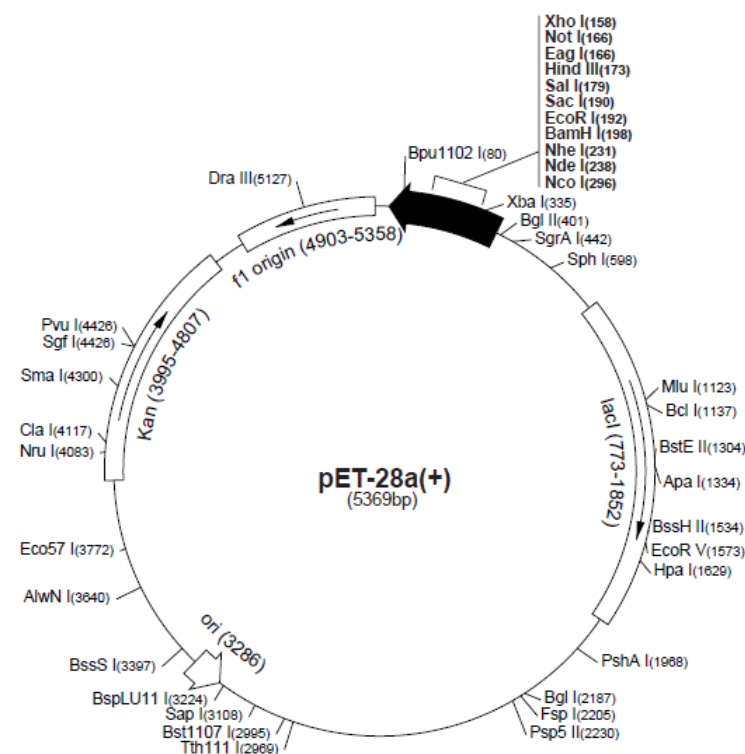


Figura 27. Mappa del vettore di espressione pET-28(a).

```

AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTGTTTAACTTT
                                                                                               NdeI
AAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGAGCCATATGGCTAGCATGACT
MetGlySerSerHisHisHisHisHisHisSerSerGlyLeuValProArgGlySerHisMetAlaSerMetThr
                    His*Tag                                thrombin
GGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTGACAAAGCTTGGCGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGA
GlyGlyGlnGlnMetGlyArgGlySerGluPheGluLeuArgArgGlnAlaCysGlyArgThrArgAlaProProProProProLeuArg
                                                                                               XhoI
TCCGGCTGCTAACAAGCCCGGTCGGGATCCGAATTCGAGCTCCGTGACAAAGCTTGGCGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTG
SerGlyCysEnd
AGATCCGGCTGCTAACAAGCCCG
    
```

Figura 28. La regione di clonaggio/espressione del vettore plasmidico pET-28(a). In figura sono riportate entrambe le sequenze della coda His6 e del sito di riconoscimento della trombina.

4.1.1 Clonaggio del cDNA della gptTG nel vettore plasmidico pGEM-T Easy

Il cDNA della transglutaminasi da fegato di *Guinea pig* è stato amplificato mediante reazione di PCR dal plasmide pKTG1 (Ikura K. et al., 1990), usando i “primer”

TGluFw e TGluRv, opportunamente progettati per introdurre due unici siti di restrizione: il sito NdeI all'estremità 5' e il sito XhoI all'estremità 3'. Il cDNA NdeI/XhoI purificato è stato poi inserito all'interno del vettore plasmidico pGEM-T Easy ed è stato sottoposto ad analisi di sequenza, al fine di verificare l'assenza di mutazioni lungo la sequenza genica. Successivamente, il ceppo di cellule di *E. coli* Top10F' è stato trasformato con il vettore plasmidico pGEM-T Easy contenente il cDNA della gptTG, inserito al suo interno mediante reazione di ligasi. Poiché, il vettore plasmidico utilizzato permetteva lo "screening" blu/bianco delle colonie batteriche, ottenute dopo il processo di trasformazione, nove colonie bianche, presumibilmente ricombinanti sono state casualmente selezionate e sottoposte a estrazione plasmidica. I plasmidi corrispondenti sono stati dunque, digeriti dalle endonucleasi prima menzionate, al fine di controllare la presenza dell'inserito di cDNA della gptTG (Figura 29).



Figura 29. Analisi di restrizione di uno dei cloni ricombinanti contenenti il cDNA della gptTG, realizzata mediante digestione del plasmide pET-28(a) con gli enzimi di clonaggio NdeI e XhoI (linea 2). La reazione ha prodotto due frammenti dal peso molecolare atteso.

La scala di DNA quantitativo con le taglie dei frammenti indicate a sinistra in figura, è mostrata nella linea 1.

Tutti i cloni selezionati risultavano ricombinanti e un secondo sequenziamento è stato eseguito al fine di testare l'integrità della sequenza ricombinante. In un primo momento, per il sequenziamento sono stati usati i "primer" universali T7 e Sp6. Dopo di ciò è stato necessario disegnare altri due "primer" interni, in modo tale da ottenere la completa sequenza di cDNA (2141bp), in quanto è possibile sequenziare solo 750-800 bp per reazione. Comparato alla sequenza del gene della gptTG (EC 2.3.2.13) pubblicata in banca dati (Ikura K. et al., 1988), il cDNA di gptTG, da noi sequenziato, presentava una mutazione missenso (TGG invece di CGG), risultante in una sostituzione di un'Arg in un Trp nella posizione amminoacidica 142.

4.1.2 Analisi di sequenza

Al fine di capire se realmente si fosse verificata una mutazione, ad esempio durante la reazione di PCR, è stata eseguita un'analisi di sequenza basata su sistemi di bioinformatica, ovvero mediante l'utilizzo dell'applicazione "protein BLAST" (Basic Local Alignment Search Tool) sviluppata dalla NCBI (National Center for Biotechnology Information) e disponibile gratuitamente sul sito internet: "www.ncbi.nlm.nih.gov". Questo comune strumento bioinformatico risulta utile per la determinazione di regioni di similarità tra diverse sequenze proteiche, attraverso l'applicazione del metodo di allineamento locale. La sequenza proteica da noi ottenuta, codificata dal cDNA di gptTG, precedentemente sequenziato, è stata ricavata usando il software "BioEdit" e poi è stata comparata con altre proteine simili presenti in banca dati. Quindi, un allineamento multiplo delle sequenze amminoacidiche omologhe ottenute, è stato eseguito usando il software "ClustalW". Da ciò è emerso che il Trp, in sostituzione dell'Arg, potrebbe essere il corretto residuo amminoacidico in posizione 142, giacché tutte le tTG eucariotiche sequenziate codificano per il residuo di Trp in tale posizione, restando dunque un amminoacido invariato all'interno di una regione genica mediamente conservata (Figura 30). La stessa anomalia è stata confermata anche in letteratura

(Gillet S.M.F.G. et al., 2004), dandoci così le giuste motivazioni per procedere con gli esperimenti di clonaggio.



Figura 30. Allineamento di sequenza tra diverse tTG eucariotiche. I residui colorati identificano la regione d'interesse per la comparazione. In tutti i casi è stato identificato un residuo di Trp invariato (W) nella posizione amminoacidica 142.

4.1.3 Clonaggio del cDNA della gptTG nel vettore d'espressione pET-28(a)

Dopo l'analisi di sequenza, il cDNA della gptTG è stato inserito nel vettore d'espressione pET-28(a). Il frammento di cDNA completo è stato ottenuto mediante doppia digestione con le endonucleasi NdeI/XhoI e successivamente è stato inserito, mediante reazioni di ligasi, operata dall'enzima T4 DNA ligasi, all'interno del plasmide pET-28(a), a sua volta digerito dai suddetti enzimi di restrizione. Le cellule di *E. coli* Top10F' sono state trasformate dal plasmide ricombinante così ottenuto. In seguito sono stati isolati due cloni batterici ricombinanti, come confermato da una doppia digestione enzimatica, eseguita sulle estrazioni plasmidiche dei cloni in esame e dall'ennesima analisi di sequenza (Figura 31).

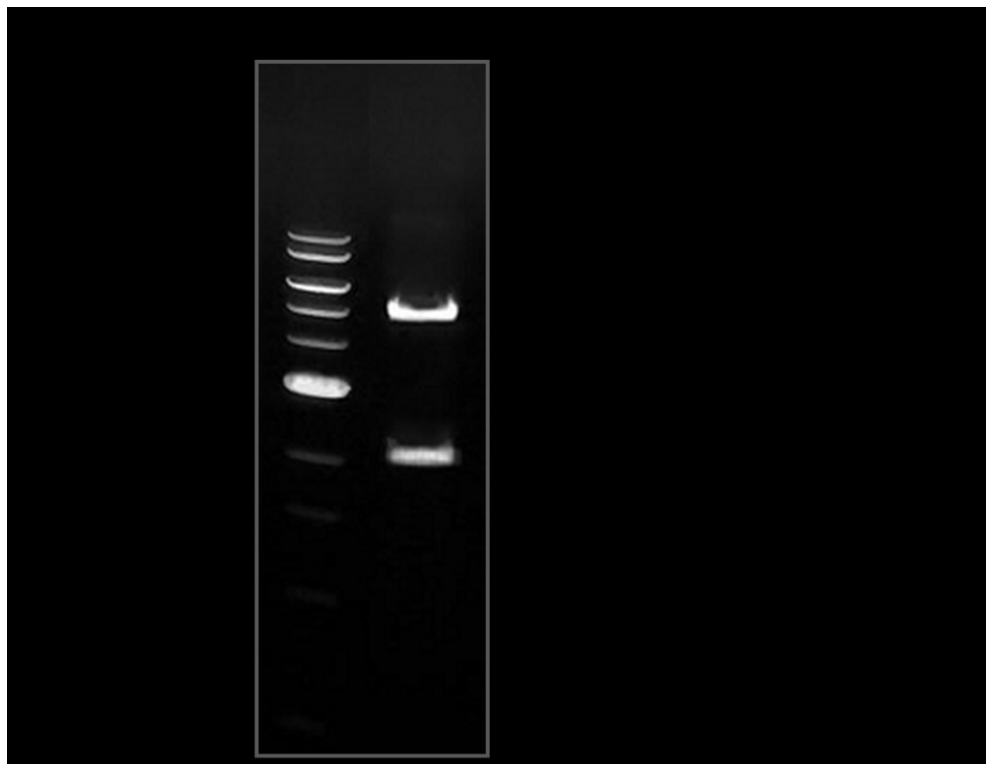


Figura 31. Analisi di restrizione di uno dei cloni ricombinanti contenente il cDNA della gptTG realizzata mediante digestione del plasmide d'espressione pET-28(a) con gli enzimi di clonaggio NdeI e XhoI (linea 2). La reazione ha prodotto due frammenti di peso molecolare atteso. La scala di DNA quantitativo con le taglie dei frammenti indicate a sinistra in figura, è mostrata nella linea 1.

4.1.4 Espressione della gptTG ricombinante in *Escherichia coli*

Il proseguimento dell'attività sperimentale ha previsto l'espressione della proteina gptTG ricombinante nel ceppo batterico di *E. coli* BL21 (DE3) Star, in quanto è noto che questa tipologia cellulare è particolarmente adatta per l'espressione di geni eterologhi inseriti in plasmidi a basso numero di copie, quindi a bassa efficienza di replicazione e aventi il promotore T7 della RNA polimerasi (ad esempio i vettori pET). Le cellule di *E. coli* BL21 (DE3) Star, contenenti il plasmide ricombinante pET-28(a)-tTG, sono state inizialmente testate per la produzione della transglutaminasi da fegato di *Guinea pig*, presentante coda esaistidinica all'estremità N-terminale, utilizzando le condizioni standard di crescita batterica. Le colture cellulari, infatti, sono state cresciute a 37 °C, in assenza di fattori aggiuntivi, che

facilitassero il ripiegamento della struttura proteica durante l'espressione. In seguito a lisi cellulare mediante sonicazione, sono state condotte le prime analisi di SDS-PAGE sia dei surnatanti sia dei "pellet" cellulari, le quali hanno rilevato la presenza di una banda di peso molecolare corrispondente a quello della gptTG (circa 77 kDa) soltanto nella frazione insolubile (dato non mostrato). L'intensità di tale banda è diventata molto più forte andando ad aumentare sia le concentrazioni di IPTG (Isopropil-tiogalattoside), utilizzato per l'induzione dell'espressione proteica, sia i tempi d'incubazione dopo l'induzione a 37 °C. Nonostante ci fosse stata una risposta positiva all'induzione con più alte concentrazioni di IPTG, i risultati ottenuti mostravano chiaramente che durante l'induzione, la proteina prodotta era instabile tendendo ad accumularsi in corpi d'inclusione, in altre parole, in aggregati proteici insolubili costituiti da proteine non ripiegate o ripiegate in modo non corretto che si originano, nei batteri, in seguito a sovra-espressione di proteine eterologhe. La tendenza della tTG ricombinante a formare corpi d'inclusione è confermata anche da diversi dati di letteratura. In un primo momento, al fine di aumentare la stabilità e la solubilità della tTG ricombinante, si è pensato di indurre l'espressione della proteina a basse temperature (Metodo A). In tali condizioni, il metabolismo batterico è rallentato, per cui la porzione di proteina espressa dovrebbe essere in grado di ripiegarsi correttamente. È risaputo, infatti, che la diminuzione della temperatura generalmente permette di ottenere maggiori quantità di proteine ricombinanti stabili, questo perché:

- 1) la reazione di aggregazione è meno facilitata, in quanto le interazioni idrofobiche sono favorite alle alte temperature;
- 2) le proteasi che si attivano alle alte temperature (Heat Shock Protein), quindi indotte in condizioni di sovraespressione proteica sono parzialmente eliminate.

L'espressione della tTG ricombinante è stata quindi, indotta a 20 °C, testando differenti concentrazioni di IPTG (0.1-1 mM) e diversi tempi di incubazione dopo l'induzione (3 h, 5 h e 15 h) (Figure 32-33). Analisi di SDS-PAGE hanno mostrato un'intensa banda proteica di peso molecolare corrispondente a quello della tTG (circa 77 kDa) nelle frazioni insolubili, derivate dai lisati delle cellule di *E. coli* indotte all'espressione della proteina, ma la stessa banda non è stata ritrovata nei controlli negativi non indotti (NI). Inoltre, l'intensità di tale banda è aumentata drasticamente prolungando i tempi d'incubazione a 20 °C, dopo induzione con

IPTG. Tuttavia, come è evidente dagli SDS-PAGE, la banda della tTG putativa, nella frazione solubile dei lisati cellulari, risultava essere ancora insufficientemente rilevata.

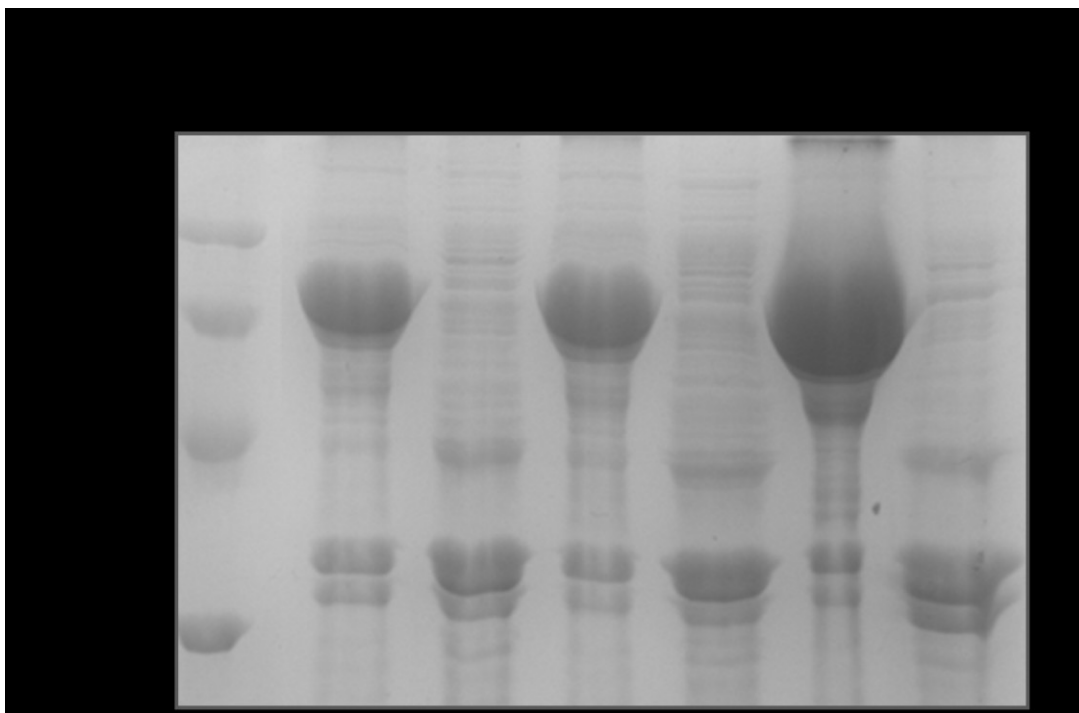


Figura 32. Prove di espressione della tTG a 20 °C, a diversi tempi di induzione. Aspetto di un gel SDS-PAGE per le frazioni insolubili ottenute dai lisati cellulari dei campioni indotti con 1 mM IPTG (I) e di quelli non indotti, rappresentanti i controlli negativi (NI). Sono stati caricati 10 μ l di ciascuna frazione per pozzetto. Linea 1, standard proteico (M). Linee 2-3, frazioni insolubili di lisati cellulari dopo 3 h di induzione. Linee 4-5, frazioni insolubili di lisati cellulari dopo 5 h di induzione. Linee 6-7, frazioni insolubili di lisati cellulari, dopo 15 h di induzione.

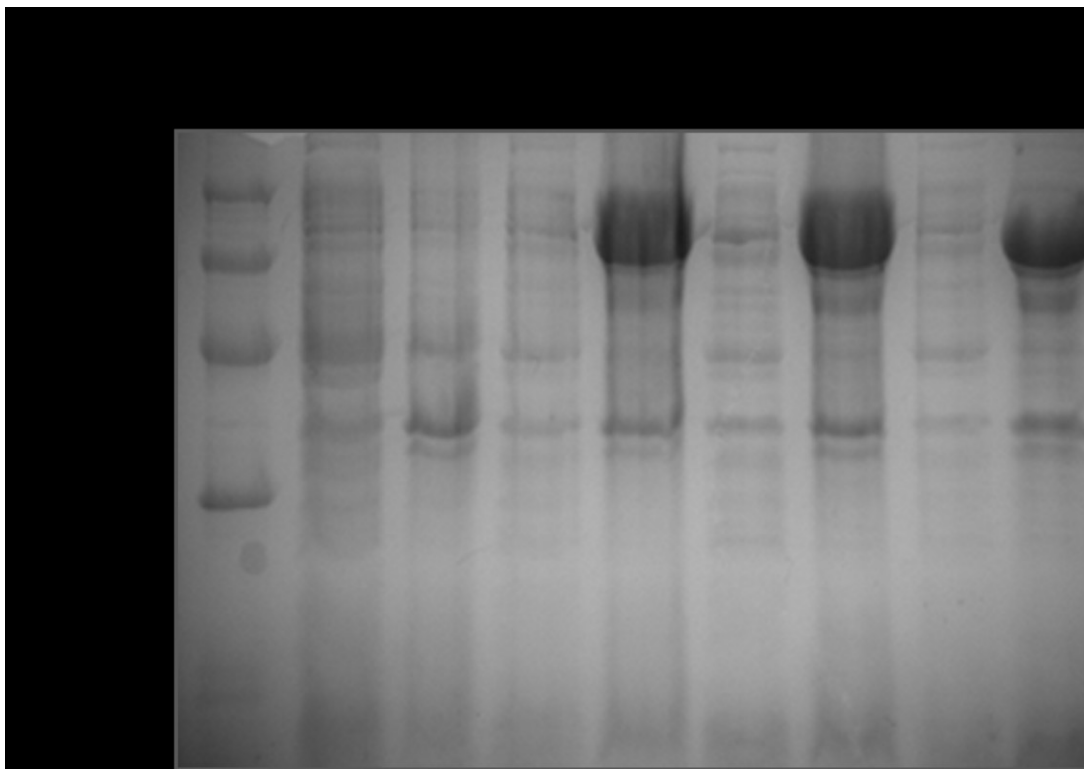


Figura 33. Prove di espressione della tTG a 20 °C, a diverse concentrazioni di IPTG. Aspetto di un gel SDS-PAGE per le frazioni solubili (CE) e insolubili (P) di cellule di *E. coli* esprimenti la tTG. Sono stati caricati 10 µl di ciascuna frazione per pozzetto. Linea 1, standard proteico (M). Linee 2-3, frazioni non indotte (controlli negativi). Linee 4-5, frazioni indotte con 0.1 mM IPTG. Linee 6-7, frazioni indotte con 0.2 mM IPTG. Linee 8-9, frazioni indotte con 0.4 mM IPTG. Tutti i campioni sono stati analizzati dopo 3 h dall'induzione.

Alla luce dei risultati ottenuti, è stato utilizzato un secondo metodo di espressione al fine di migliorare la solubilità e la stabilità della tTG ricombinante (Metodo B). Quest'approccio coinvolge l'uso sia dello stress osmotico, mediante utilizzo di sorbitolo (1 M) che di chaperoni chimici, quale la betaina (2.5 mM), che si ritiene essere esclusa dagli immediati domini proteici, causando, da un punto di vista termodinamico, una "idratazione preferenziale" sfavorevole, quindi, una minimizzazione del contatto proteina-solvente e una stabilizzazione della struttura proteica (Blackwell J.M. et al., 1991). Il fatto che il plasmide di espressione per la gptTG ricombinante fornisse alti livelli di produzione proteica nelle cellule di *E. coli*, la maggior parte della quale, però, in forma insolubile, era probabilmente dovuto al fatto che l'espressione proteica procedesse troppo rapidamente e la concentrazione di proteina prodotta diventasse velocemente troppo elevata per

essere rimodellata correttamente a livello cellulare. In altre parole, la quantità di modulatori endogeni responsabili del corretto ripiegamento proteico, probabilmente erano insufficienti per il ripiegamento corretto dell'enzima ricombinante sovraespresso. È ben noto, infatti, che i batteri presentano diversi meccanismi di difesa per proteggere le proteine native dal mancato rimodellamento e dall'aggregazione, causati da stress osmotico e/o calore. In queste condizioni la sintesi di chaperoni molecolari aumenta, al fine di guidare attivamente i processi di ripiegamento, prevenendo l'aggregazione proteica. È stato inoltre, osservato che anche l'accumulo intracellulare di osmoliti può stabilizzare lo stato nativo delle proteine. Infatti, sembra che queste molecole possano agire come chaperoni chimici, poiché l'esposizione dello scheletro di proteine denaturate agli osmoliti, può provocare la destabilizzazione termodinamica dello stato non ripiegato con conseguente stabilizzazione della struttura proteica nativa. Per queste ragioni, le cellule ricombinanti di *E. coli* sono state coltivate in presenza di betaina (chaperone chimico) e sorbitolo (induttore di stress osmotico), indotte con 0.1 mM IPTG e incubate a 28 °C per 15 h dopo l'induzione. In queste condizioni sembra sia stato ottenuto un leggero aumento della stabilità proteica, in quanto, analisi di SDS-PAGE hanno rivelato la presenza di una banda dal peso molecolare atteso, nella frazione solubile dei lisati cellulari ottenuti dalle cellule trattate con betaina/sorbitolo. Inoltre, la stessa banda non è stata visualizzata nelle frazioni solubili dei campioni di controllo, cresciuti nelle stesse condizioni sperimentali, ma in assenza di betaina e sorbitolo (Figura 34). Tuttavia, la stabilità e la solubilità della gptTG osservate sono ancora insufficienti, poiché la maggior parte della proteina ricombinante è ancora presente nei corpi d'inclusione. Per questa ragione, sono necessarie altre indagini per ottimizzare il protocollo di espressione per la proteina gptTG ricombinante, al fine di ottenere un più alto rapporto tra proteina solubile/insolubile.

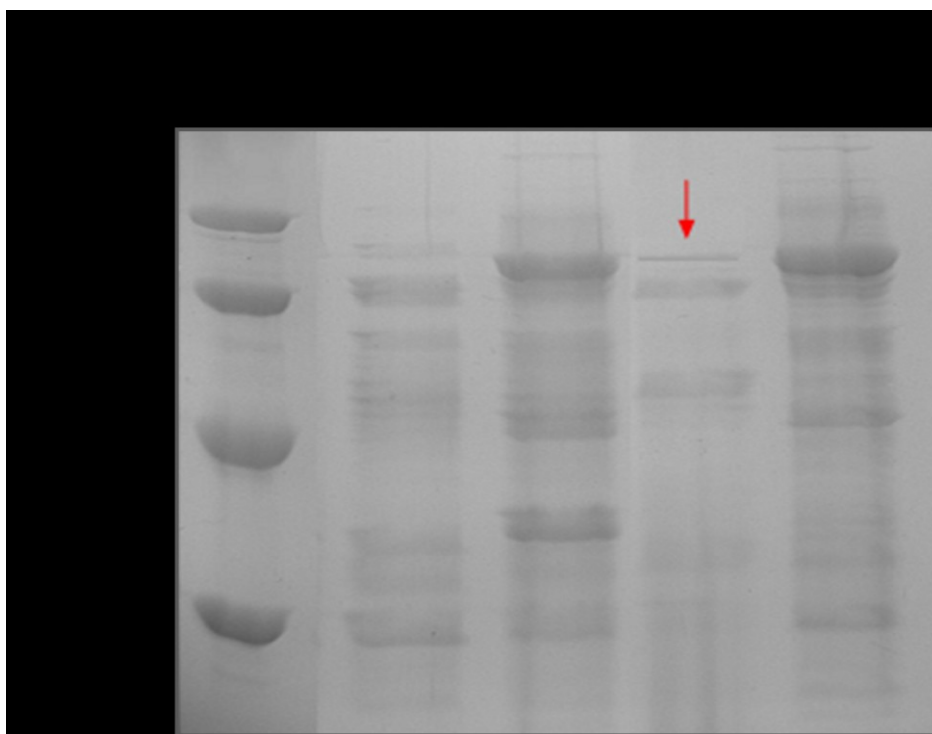


Figura 34. Espressione delle tTG a 20 °C. Aspetto di un gel SDS-PAGE delle frazioni solubili (CE) e insolubili (P) da lisati cellulari di *E. coli* esprimenti la tTG ricombinante. Sono stati caricati 10 µl di ciascuna frazione per pozzetto. Linea 1, standard proteico (M). Linee 2-3, estratti cellulari e detriti cellulari ottenuti in assenza di betaina/sorbitolo. Linee 4-5, estratti cellulari e detriti cellulari ottenuti in presenza di betaina/sorbitolo. Tutti i campioni sono stati indotti per 15 h a 28 °C, con 0.1 mM IPTG.

4.1.5 Determinazione dell'attività specifica della gptTG ricombinante

L'attività specifica dell'His6-gptTG presente nelle frazioni solubili, ottenute dal lisato degli indotti cellulari, processati nel modo appena descritto, è stata misurata mediante il saggio colorimetrico dell'idrossammato, utilizzando come substrati di reazione il Cbz-Gln-Gly e l'idrossilammina (Folk J.E. & Cole P.W., 1966). I risultati ottenuti da tali esperimenti hanno dato esito positivo, nel senso che è stato possibile osservare un viraggio di colore nella miscela di reazione contenente la frazione solubile (all'incirca 8 mg/ml di proteine totali) del lisato batterico, ottenuto dalla crescita cellulare in presenza di betaina/sorbitolo, ma non è stato possibile quantizzare l'ammontare di gptTG espressa, vista l'esigua produzione di enzima

solubile (Figura 35). In conclusione, tale saggio enzimatico ha fornito un'altra prova che l'utilizzo di betaina e sorbitolo nel protocollo di espressione della gptTG ricombinante, sembra favorire la stabilità proteica, ma nonostante ciò, la quantità di enzima prodotto è ancora insufficiente per pensare di passare alla messa a punto di un efficiente protocollo di purificazione per la proteina di nostro interesse.



Figura 35. Saggio colorimetrico dell'idrossammato. La cuvetta di colore arancione contiene la miscela di reazione con la frazione solubile, ottenuta dal lisato degli indotti cellulari di *E. coli* in presenza di betaina e sorbitolo; la cuvetta di colore giallo, invece, contiene la miscela di reazione con la frazione solubile, ottenuta dal lisato di campioni cellulari non indotti ma trattati nelle stesse condizioni sperimentali degli indotti (controlli negativi). Il colore arancione è indice della presenza della proteina ricombinante.

4.2 Valutazioni funzionali del biosensore: indagini di fluorescenza

4.2.1 Selezione d'immunoreagenti e marcatura con sonde fluorescenti

Al fine di realizzare il biosensore a fluorescenza proposto, è stato necessario scegliere appropriati reagenti. Viste le non poche difficoltà incontrate nella messa a punto di un efficiente protocollo di espressione della proteina gptTG ricombinante, si è pensato di intraprendere uno studio funzionale parallelo che andasse a far luce sui processi interazionali verificatisi tra gli immunoreagenti selezionati, passo preliminare alla realizzazione del biosensore a fluorescenza. In attesa di ottenere la proteina gptTG ricombinante, preparazioni commercialmente disponibili di transglutaminasi da fegato di *Guinea pig* sono state selezionate come antigene per lo sviluppo di un saggio a fluorescenza, realizzato anche con l'utilizzo di anticorpi policlonali anti-gptTG. Tali anticorpi sono stati prodotti mediante immunizzazione di conigli con le preparazioni commerciali di enzima. Le IgG dal siero degli animali sacrificati sono state purificate utilizzando una cromatografia per affinità. La resina impiegata è stata funzionalizzata con la "Protein A", una molecola di 41 kDa estratta dalla parete cellulare di *Staphylococcus aureus*, che lega con grande affinità (circa 10^{-8} M per le IgG umane) la regione Fc degli anticorpi. Gli immunoreagenti selezionati sono stati rispettivamente marcati con cromofori estrinseci. La tTG di *G. pig* è stata marcata con il DyLight Fluor 594, che ha agito come donatore di energia di trasferimento, mentre gli anticorpi anti-tTG da coniglio sono stati marcati con il DyLight Fluor 649, in modo da agire come accettore di energia di trasferimento. Entrambi i marcatori sono sonde fluorescenti ammino-reattive, cioè presentanti i gruppi esterici-NHS. I fluorofori DyLight 594 (λ_{EX} : 593 nm; λ_{EM} : 618 nm) e DyLight 649 (λ_{EX} : 646 nm; λ_{EM} : 674 nm) sono stati scelti come coppia donatore/accettore, in quanto i loro spettri di emissione e di assorbimento apparivano sufficientemente sovrapposti per permettere la realizzazione del fenomeno della FRET (Figura 36).

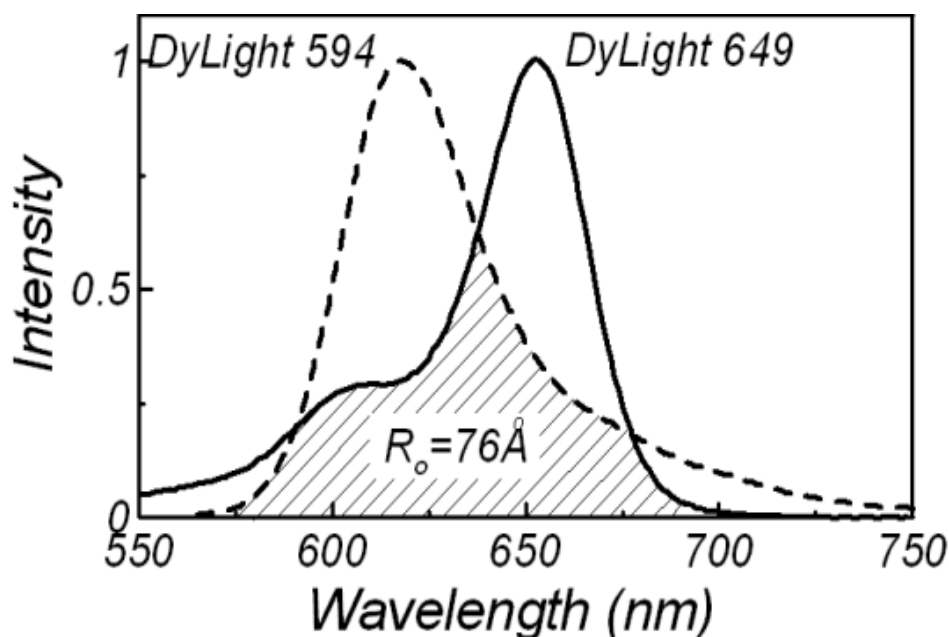


Figura 36. Sovrapposizione tra lo spettro di emissione del donatore (DyLight 594) e quello di assorbimento dell'accettore (DyLight 649). Il donatore è stato eccitato a $\lambda_{\text{EX}} = 530 \text{ nm}$. Il massimo di assorbimento dell'accettore è stato registrato a $\lambda_{\text{EM}} = 655 \text{ nm}$.

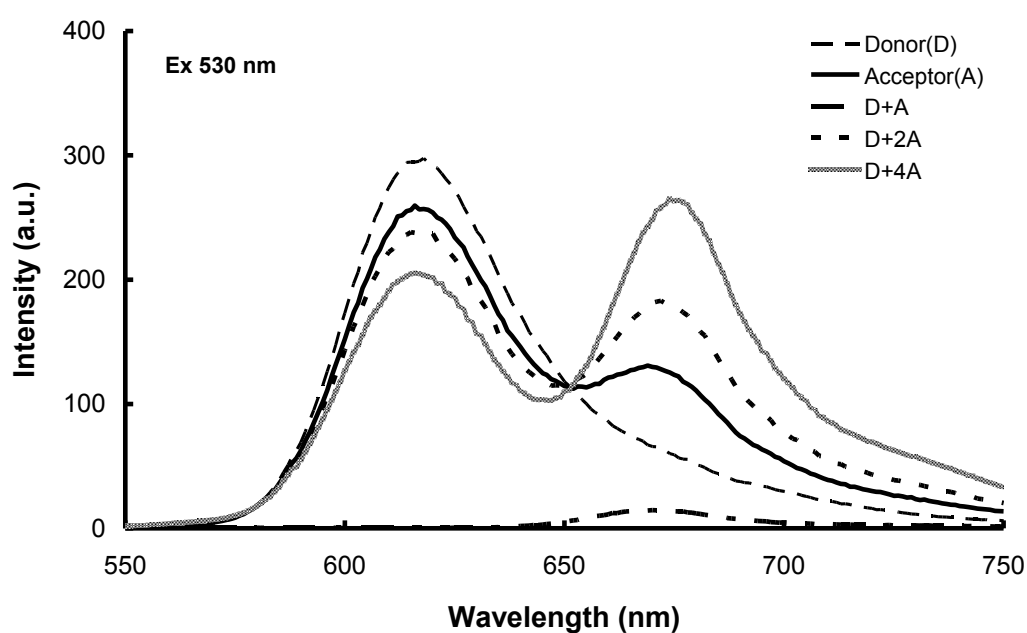
La strategia di marcatura proposta si è basata su una coniugazione chimica tra le proteine e le corrispondenti sonde fluorescenti. Considerando che la tTG di *Guinea pig* ha molteplici gruppi amminici liberi, il fluoroforo ammino-reattivo DyLight 594 è stato utilizzato per marcare l'antigene precisamente su questi residui. Il grado di marcatura della proteina è stato calcolato essere intorno a 2 moli di marcatore fluorescente per ogni mole di antigene.

Per quanto riguarda la coniugazione degli anticorpi anti-tTG da coniglio con il DyLight 649, è stata eseguita una marcatura chimica globale delle proteine sui residui di lisine, con un'efficienza di marcatura pari a circa 5 moli di fluoroforo per mole di anticorpi. Tale scelta è giustificata dalle grosse dimensioni degli anticorpi ($> 100 \text{ Å}$). Infatti, considerando la struttura tridimensionale di un anticorpo, solo i residui amminoacidici localizzati vicino al sito di legame, potrebbero trovarsi nella giusta distanza di Förster con i residui amminoacidici presenti sugli epitopi dell'antigene. Inoltre, a questo punto della sperimentazione, non è stato possibile selezionare un sito specifico di marcatura, in quanto, non c'erano sufficienti informazioni circa le proprietà dei residui amminoacidici coinvolti nel

riconoscimento e nel legame antigene-anticorpo. Tali esperimenti, infatti, sono stati principalmente eseguiti per verificare l'efficienza del saggio di FRET. La strategia di marcatura da noi impiegata, è stata quindi, utile per accertare la presenza di FRET tra il complesso Ag-donatore/Ab-accettore. Tuttavia, sono necessari successivi miglioramenti al fine di ottenere maggiore sensibilità nel saggio.

4.2.2 Saggio di "FRET": misure di fluorescenza in stadio stazionario

Misure di fluorescenza in stadio stazionario sono state inizialmente eseguite al fine di verificare gli effetti dell'aggiunta degli anticorpi anti-tTG-DyLight 649 sulla fluorescenza emessa dalla tTG marcata con il DyLight 594. Gli spettri di emissione della tTG-DyLight 594 e degli anticorpi anti-tTG-DyLight 649 sono stati acquisiti prima e dopo incubazione della tTG-DyLight 594 con concentrazioni crescenti di anticorpi anti-tTG-DyLight 649 (Figura 37).



(a)

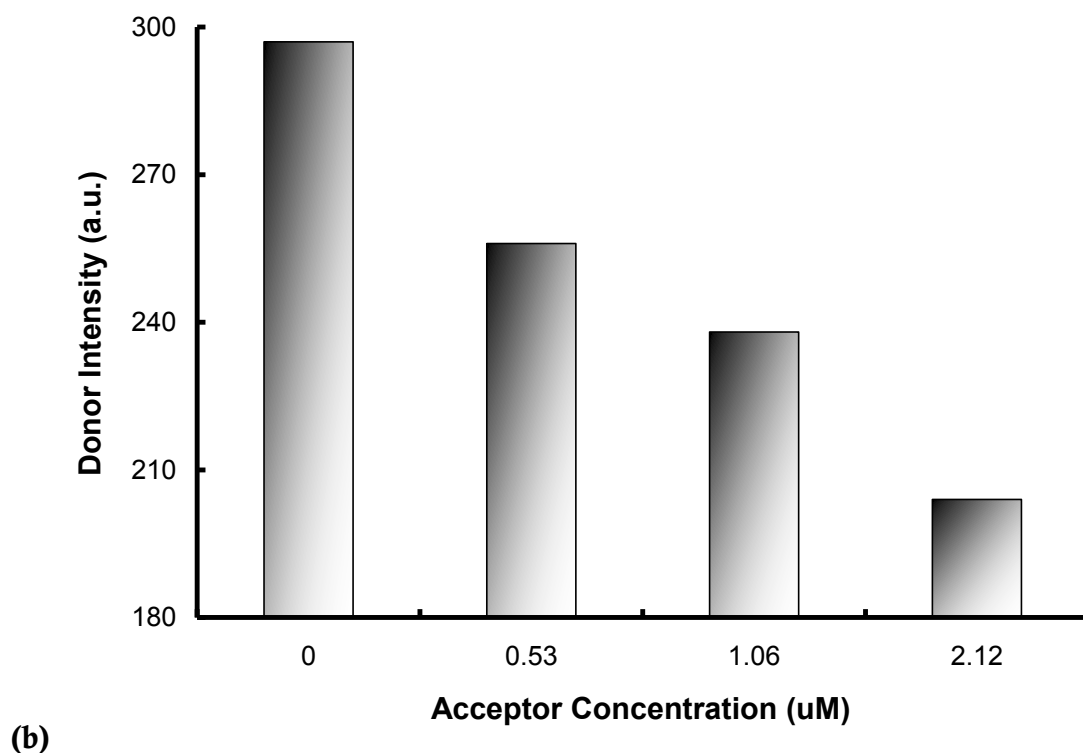
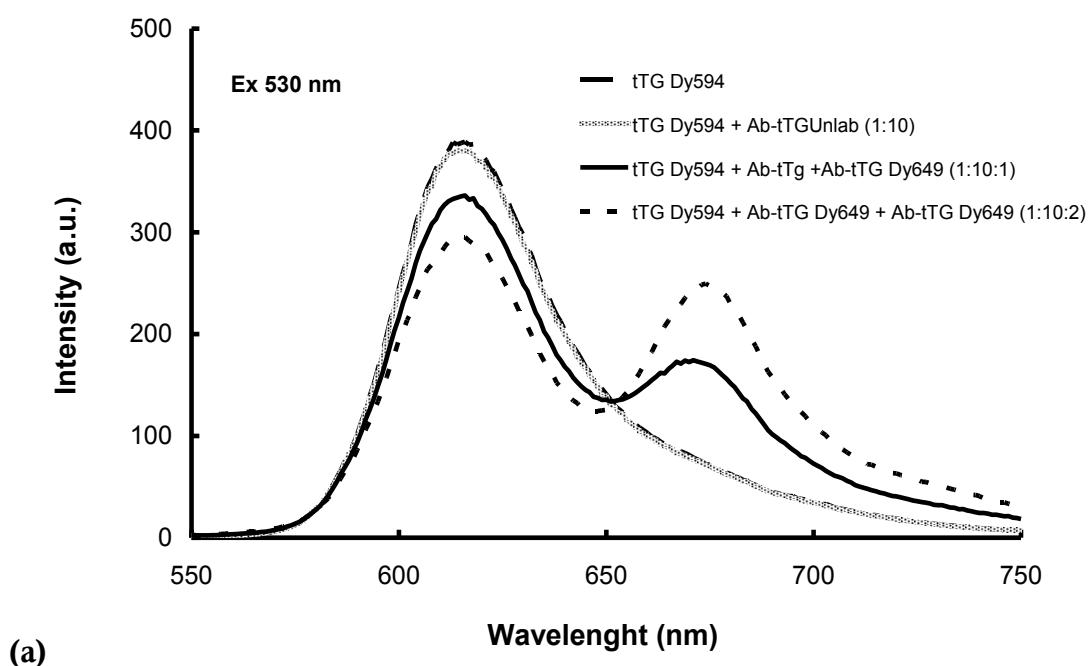


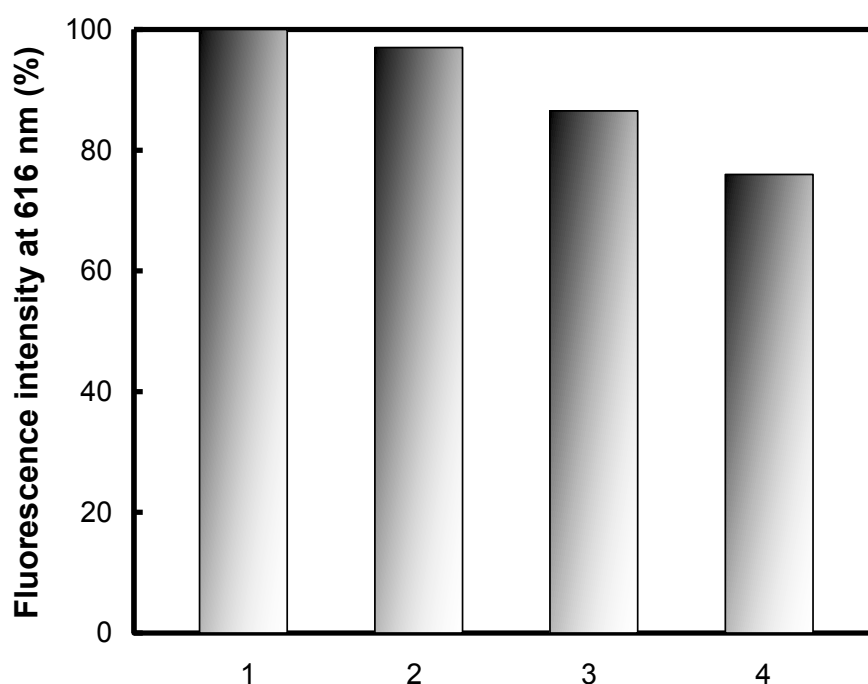
Figura 37. (a) Spettri di emissione della tTG-DyLight 594 (D) e degli anticorpi anti-tTG-DyLight 649 (A) eccitati a $\lambda_{EX}= 530$ nm. (b) Effetti dell'aggiunta di concentrazioni crescenti di anticorpi anti-tTG-DyLight 649 sull'emissione della tTG-DyLight 594 ($\lambda_{EM}= 616$ nm).

L'osservata diminuzione nell'emissione di fluorescenza del DyLight 594 (donatore) è dovuta al processo di trasferimento di energia realizzatosi quando gli immunoreagenti marcati con la coppia D/A interagiscono strettamente (FRET). In particolare, è stato osservato circa il 40% di diminuzione del segnale fluorescente, dopo l'aggiunta di 2.12 μ M di anticorpi anti-tTG-DyLight 649 (Figura 37 (a)). La diminuzione lineare di fluorescenza, registrata in presenza di concentrazioni crescenti di anticorpi marcati è riportata in Figura 37 (b). Come aspettato, la riduzione del segnale di fluorescenza non è stata molto pronunciata, probabilmente perché diversi fluorofori legati agli anticorpi non si trovavano in distanza di Förster con i fluorofori localizzati sull'antigene. Per questa ragione, la fluorescenza emessa dal DyLight 594 coniugato alla tTG non è totalmente smorzata dal riconoscimento antigene-anticorpo.

Sono stati, poi, testati gli effetti dell'aggiunta degli anticorpi anti-tTG-DyLight 649 sull'emissione di fluorescenza del complesso tTG-DyLight 594/Ab anti-tTG da

coniglio non marcati. Quando un eccesso molare, due volte maggiore ($1.06 \mu\text{M}$), di anticorpi anti-tTG-DyLight 649 è stato aggiunto alla tTG-DyLight 594, previamente saturata con un eccesso molare di anticorpi policlonali anti-tTG da coniglio non marcati, dieci volte maggiore ($5.3 \mu\text{M}$), non è stata registrata un'evidente riduzione dell'effetto di smorzamento della fluorescenza. Infatti, l'emissione di fluorescenza registrata in queste condizioni sperimentali era paragonabile a quella rilevata in assenza degli anticorpi non marcati (Figura 38). Questo fenomeno, molto probabilmente, è causato dall'instaurarsi di una competizione per il legame con l'antigene, tra gli anticorpi policlonali anti-tTG marcati con il DyLight 649 e quelli non marcati con la sonda fluorescente. Questo risultato suggerisce che la strategia del rilevamento immunologico potrebbe essere adatta per la determinazione della presenza degli anticorpi anti-transglutaminasi nel siero di pazienti celiaci, attraverso l'utilizzo di un saggio competitivo che sfrutta i principi della fluorescenza.





(b)

(0.53 μ M) DyLight 594-tTG	+	+	+	+
(5.3 μ M) Unlabeled Ab-tTG	-	+	+	+
(0.53 μ M) DyLight 649 Ab-tTG	-	-	+	+(x2)

Figura 38. (a) Effetti degli Ab anti-tTG marcati con il DyLight 649 sulla fluorescenza emessa dalla tTG-DyLight 594 in presenza di 5.3 μ M di anticorpi anti-tTG non marcati. In Figura 38 (b) è mostrato lo smorzamento della fluorescenza emessa dalla tTG-DyLight 594 a causa di una competizione stabilitasi tra i due tipi di anticorpi.

4.2.3 Saggio di “FRET”: misure di fluorescenza risolta nel tempo

Misure di fluorescenza risolta nel tempo sono state eseguite al fine di chiarire la natura della modesta diminuzione d'intensità di fluorescenza emessa dalla tTG-DyLight 594, osservata negli esperimenti di fluorescenza statica, in quanto, il trasferimento di energia di risonanza può essere seguito con più precisione, utilizzando le misure di “lifetime”. Con questo tipo di misure è stato possibile

distinguere le subpopolazioni di molecole eccitate, indiscernibili mediante osservazioni di fluorescenza statica. Lo stesso esperimento eseguito per acquisire le misure di fluorescenza in stadio stazionario, è stato realizzato attraverso osservazioni di fluorescenza risolta nel tempo.

In un primo momento è stato monitorato il cambiamento del tempo di vita medio (average lifetime) del donatore (tTG-DyLight 594) prima e dopo aggiunta di concentrazioni crescenti di accettore (Ab anti-tTG-DyLight 649) (Figura 39 e Tabella 4).

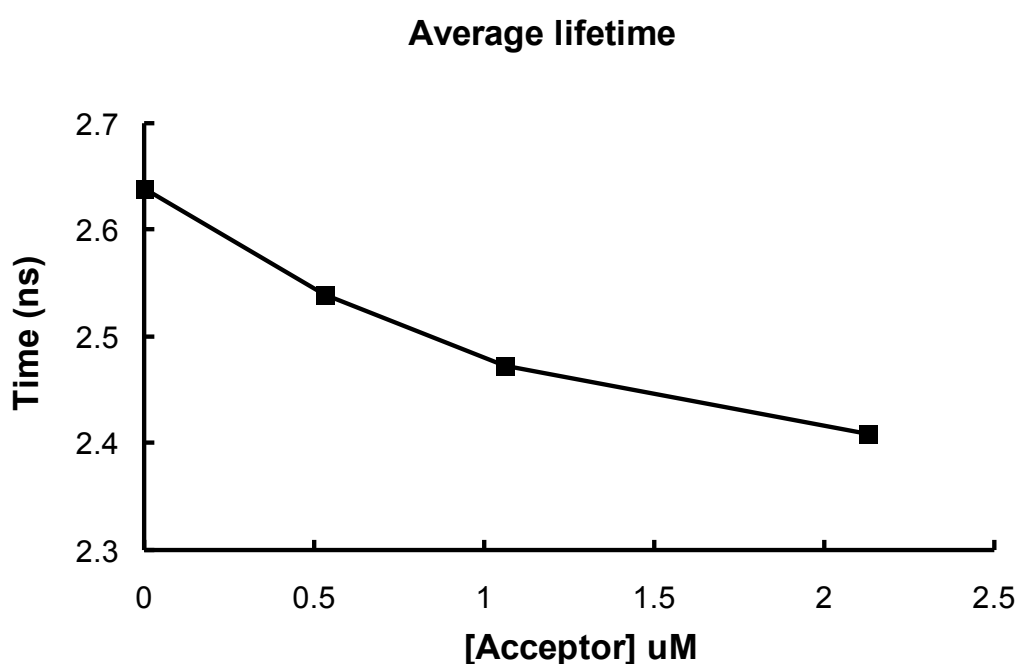


Tabella 4. Time(ns) [D]uM [A]uM

Donatore	2.33	0.53	0
Donatore+Accettore (1:1)	2.25	0.53	0.53
Donatore+Accettore (1:2)	2.17	0.53	1.06
Donatore+Accettore (1:4)	2.10	0.53	2.13

Figura 39. Effetti dell'aggiunta di Ab anti-tTG-DyLight 649 (A) sul decadimento di fluorescenza del DyLight 594 (D) coniugato alla tTG. In figura è mostrato il cambiamento del "lifetime" medio del D prima e dopo aggiunta di concentrazioni crescenti di A (Tabella 4).

In tali condizioni abbiamo registrato una diminuzione nel “lifetime” del donatore (tTG-DyLight 594) non molto significativa. Tale risultato, non è a sostegno dei dati ottenuti con le misure di fluorescenza statica, i quali indicavano l’esistenza di un fenomeno di trasferimento di energia dal donatore all’accettore, rispettivamente coniugati alle molecole biologiche in esame.

In presenza di energia di trasferimento, il decadimento dell’intensità di fluorescenza del donatore rivela come le molecole di accettore sono distribuite nello spazio intorno alle molecole di donatore. Perciò, nel nostro caso abbiamo valutato il contributo percentuale delle diverse componenti di “lifetime” del donatore, prima e dopo aggiunta di concentrazioni crescenti di accettore, rispettivamente coniugati alla tTG e agli Ab anti-tTG (Figura 40 e Tabella 5).

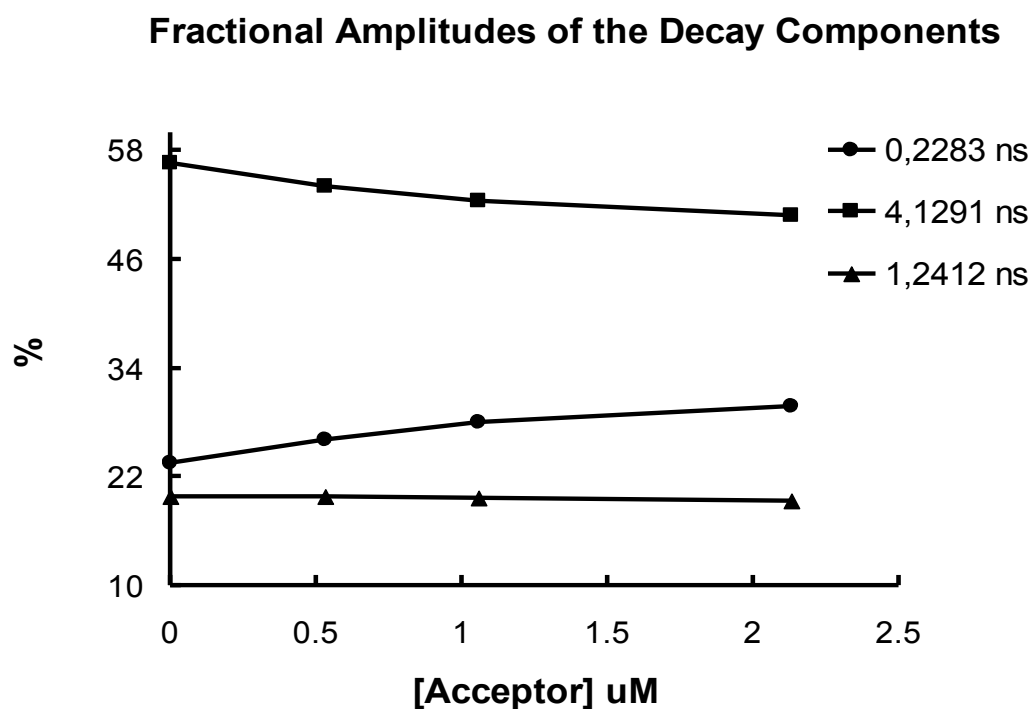


Tabella 5.

	Time(ns)	%a1	%a2	%a3	[D]uM	[A]uM
Donatore	2.64	23.57	56.6	19.78	0.53	0
Donatore+Accettore (1:1)	2.54	26.05	54.11	19.84	0.53	0.53
Donatore+Accettore (1:2)	2.47	27.95	52.44	19.61	0.53	1.06
Donatore+Accettore (1:4)	2.41	29.81	50.9	19.29	0.53	2.13

Figura 40. Effetti dell'aggiunta di Ab anti-tTG-DyLight 649 (A) sul decadimento di fluorescenza del DyLight 594 (D) coniugato alla tTG. In figura è mostrato il contributo percentuale della componente discreta di lifetime del D prima e dopo aggiunta dell'A (Tabella 5).

La Figura 40 mostra il contributo percentuale della componente lunga di “lifetime” del donatore, ovvero il contributo di tutte le molecole di donatore che trovandosi in un microambiente più rigido, quindi meno esposto all'ambiente acquoso, impiegano più tempo per passare dallo stato eccitato a quello fondamentale. Tale contributo percentuale, di circa 4.1 ns, diminuiva stabilmente ma non di molto. Per contro, la componente breve di “lifetime” del donatore, rappresentata da tutte le molecole di donatore più esposte al solvente acquoso, quindi favorite a passare più velocemente dallo stato eccitato a quello fondamentale, mostrava un leggero aumento (~ 0.22 ns). I valori percentuali dei contributi delle singole componenti di “lifetime” del donatore sono schematizzati in Tabella 4. Tali dati indicano che, dopo l'aggiunta di concentrazioni crescenti di accettore coniugato agli Ab anti-tTG, una ridotta popolazione di donatore, corrispondente alla componente lunga di “lifetime”, coniugata alla tTG, subisce una lieve diminuzione di emissione di fluorescenza, inducendo quindi, un lieve aumento della componente breve di “lifetime” del donatore.

4.2.4 Saggio di “FRET”: misure di fluorescenza in configurazione “front-face”

È importante notare che in soluzione, la dinamica delle interazioni tra antigene e anticorpi cambia, inducendo al cambiamento anche i valori di FRET, quando tali

molecole biologiche sono marcate con una coppia di fluorofori che si comporta da donatore/accettore di energia di trasferimento. Inoltre, in soluzione, anche il rapporto stechiometrico tra Ag-Ab tende a variare e ciò sembra che sia causato dalla natura policlonale degli anticorpi, utilizzati in tutte le procedure sperimentali da noi eseguite. Al fine di evitare tali implicazioni, i complessi Ag-Ab, rispettivamente coniugati a sonde fluorescenti, sono stati immobilizzati su supporti solidi in modo tale da acquisire misure di fluorescenza in configurazione “front-face”. Spettri di emissione di fluorescenza sono stati, dunque, acquisiti per la tTG-DyLight 594 (1.32 uM) e gli Ab anti-tTG-DyLight 649 (0.66 uM), rispettivamente immobilizzati in maniera non-covalente su lastre di vetro (22 mm x 22 mm) e eccitati ad una lunghezza d’onda di 530 nm. Gli spettri risultanti, hanno confermato che entrambi i campioni erano stati immobilizzati con successo sulle superfici di vetro (Figura 41).

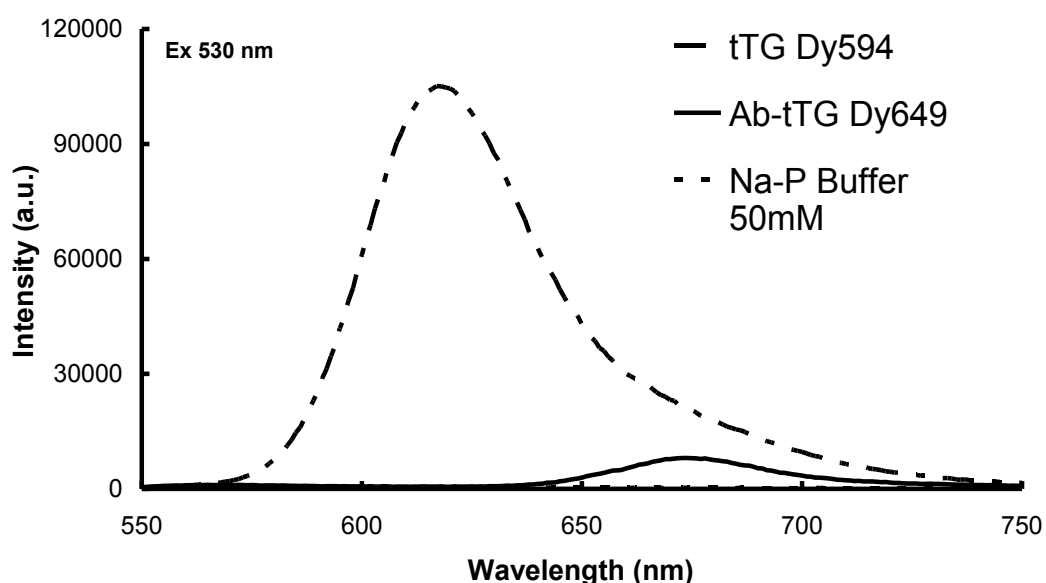


Figura 41. Spettri di emissione della tTG-DyLight 594 e degli Ab anti-tTG-DyLight 649 misurati in configurazione front-face, a $\lambda_{EX} = 530$ nm.

In seguito, sono stati misurati rispettivamente gli spettri di emissione della tTG-DyLight 594 (immobilizzata su vetro) dopo aggiunta e incubazione di una soluzione di 0.66 uM di Ab anti-tTG-DyLight 649 e degli Ab anti-tTG DyLight 649 (immobilizzati su vetro) dopo aggiunta ed incubazione di una soluzione di 1.32 uM

di tTG marcata con DyLight 594. Tutte le misure di fluorescenza sono state eseguite a una λ_{EX} di 530nm (Figura 42).

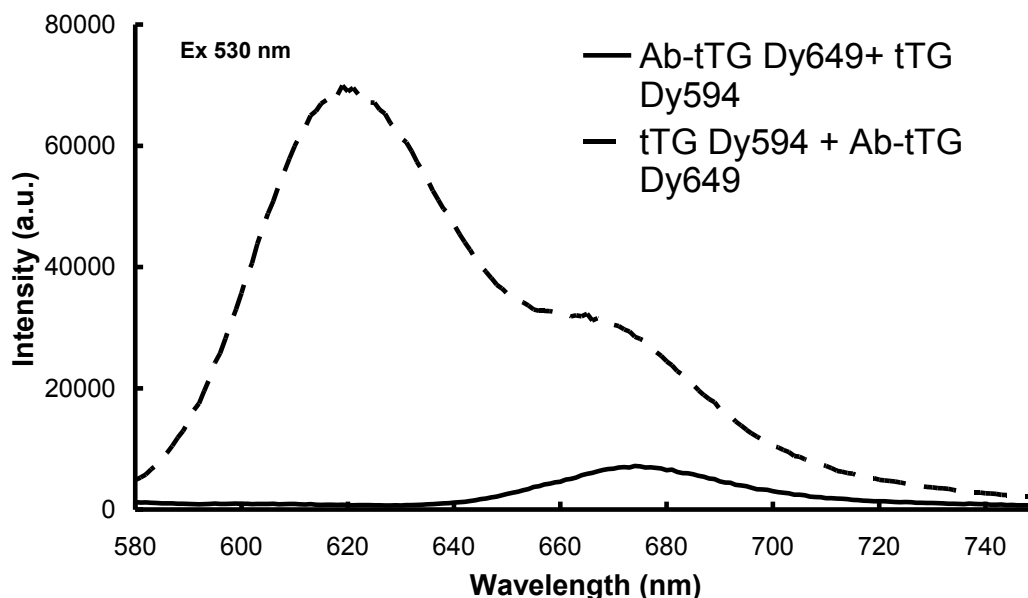


Figura 42. Spettri di emissione degli Ab anti-tTG-DyLight 649 (immobilizzati) dopo aggiunta di una soluzione di tTG-DyLight 594 e della tTG-DyLight 594 (immobilizzata) dopo aggiunta di una soluzione di Ab anti-tTG-DyLight 649. Gli spettri sono stati acquisiti in configurazione front-face a un λ_{EX} = 530 nm.

Gli spettri indicano che in queste condizioni sperimentali, le interazioni Ag-Ab, non possono essere monitorate quando gli anticorpi anti-tTG, coniugati con il DyLight 649, sono immobilizzati sulla superficie di vetro. Per contro, quando a essere immobilizzato sul supporto solido, è l'antigene tTG, coniugato con il DyLight 594, le interazioni Ag-Ab sono evidenti. Il mancato legame tra Ag-Ab verificatosi quando a essere immobilizzati su vetro c'erano gli Ab anti-tTG, potrebbe essere spiegato dal fatto che i siti di riconoscimento della tTG sugli anticorpi policlonali non erano sufficientemente esposti per la realizzazione del legame tra Ag e Ab.

Inoltre, al fine di misurare quanti anticorpi anti-tTG-DyLight 649 si fossero legati alla tTG-DyLight 594, previamente immobilizzata su supporto solido, abbiamo acquisito gli spettri di emissione dell'accettore per entrambi i campioni utilizzati

nell'esperimento precedente. In questo caso, tutte le misure sono state acquisite a una lunghezza d'onda di eccitazione di 635 nm, in modo tale da eccitare soltanto l'accettore (Figura 43).

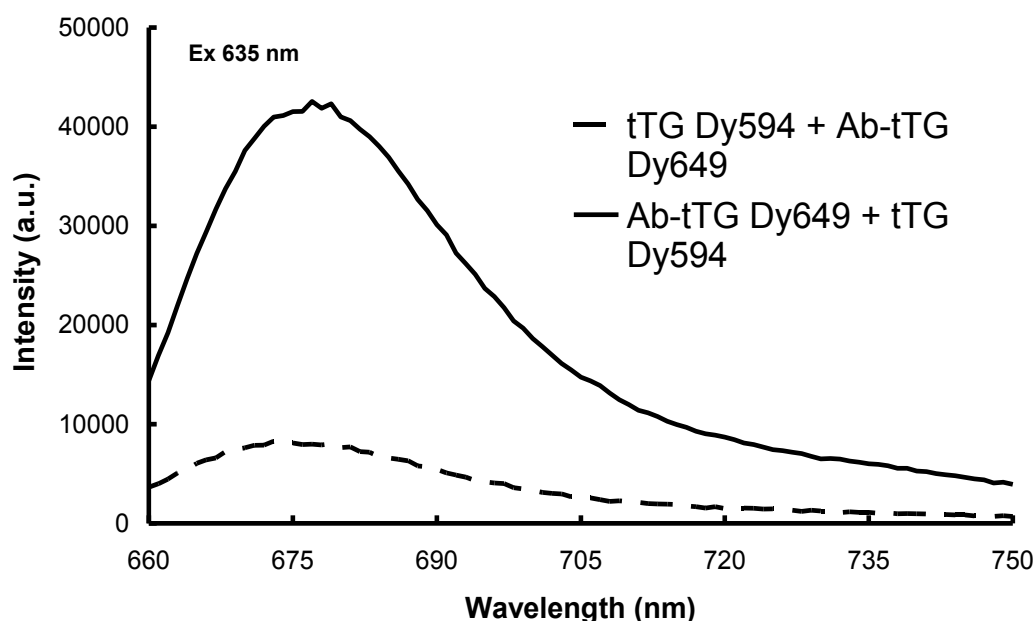


Figura 43. Spettri di emissione degli Ab anti-tTG-DyLight 649 (immobilizzati) dopo aggiunta di una soluzione di tTG-DyLight 594 e della tTG-DyLight 594 (immobilizzata) dopo aggiunta di una soluzione di Ab anti-tTG-DyLight 649. Gli spettri sono stati acquisiti in configurazione front-face a un $\lambda_{EX} = 635$ nm.

Dai dati ottenuti, considerando il rapporto tra il picco di emissione di fluorescenza più basso, relativo al vetrino con la tTG-DyLight 594 immobilizzata e la soluzione di Ab anti-tTG-DyLight 649 aggiunta ad essa e il picco di emissione di fluorescenza più alto, relativo invece al vetrino con gli Ab anti-tTG-DyLight 649 immobilizzati e la soluzione di tTG-DyLight 594 aggiunta ad essi, è stato calcolato che solo il 20% della soluzione di Ab anti-tTG-DyLight 649, aggiunta in soluzione e fatta incubare sulla lastrina già ricoperta dalla tTG-DyLight 594, si è legata all'antigene. Questo risultato, probabilmente, può essere dovuto alla natura policlonale degli anticorpi utilizzati.

4.2.5 Determinazioni di fluorescenza a livello di singola molecola

L'ultima parte dell'attività sperimentale ha previsto l'utilizzo della Microscopia confocale in Fluorescenza per sviluppare uno studio più approfondito circa le interazioni Ag-Ab, volto alla determinazione di singole molecole, che rappresenta il massimo livello di sensibilità raggiunto dai metodi analitici.

4.2.5.1 Studi di Spettroscopia di Correlazione di Fluorescenza

Tra le diverse metodiche di rilevamento di singola molecola è stata scelta la Spettroscopia di Correlazione di Fluorescenza (FCS) che rappresenta una potente applicazione per lo studio delle interazioni biomolecolari in soluzione, rilevate in un intervallo temporale dell'ordine dei microsecondi. Tale tecnologia, basandosi sull'analisi delle intensità di fluttuazioni di fluorescenza di singole molecole che diffondono, per unità di tempo, all'interno di un piccolo volume, definito da un raggio di luce focalizzata e da un'apertura confocale, ci ha permesso di studiare le dinamiche interazionali verificatesi tra la gptTG-DyLight 594 e gli Ab anti-tTG-DyLight 649. Le misure di FCS sono state, quindi, eseguite in soluzione, sia per molecole di gptTG-DyLight 594 (15 nM) in forma libera (diffusione veloce) sia in presenza degli Ab anti-tTG-DyLight 649 (1 nM) legati parzialmente alle molecole di antigene marcato (diffusione lenta del complesso Ag-Ab) (Figura 44).

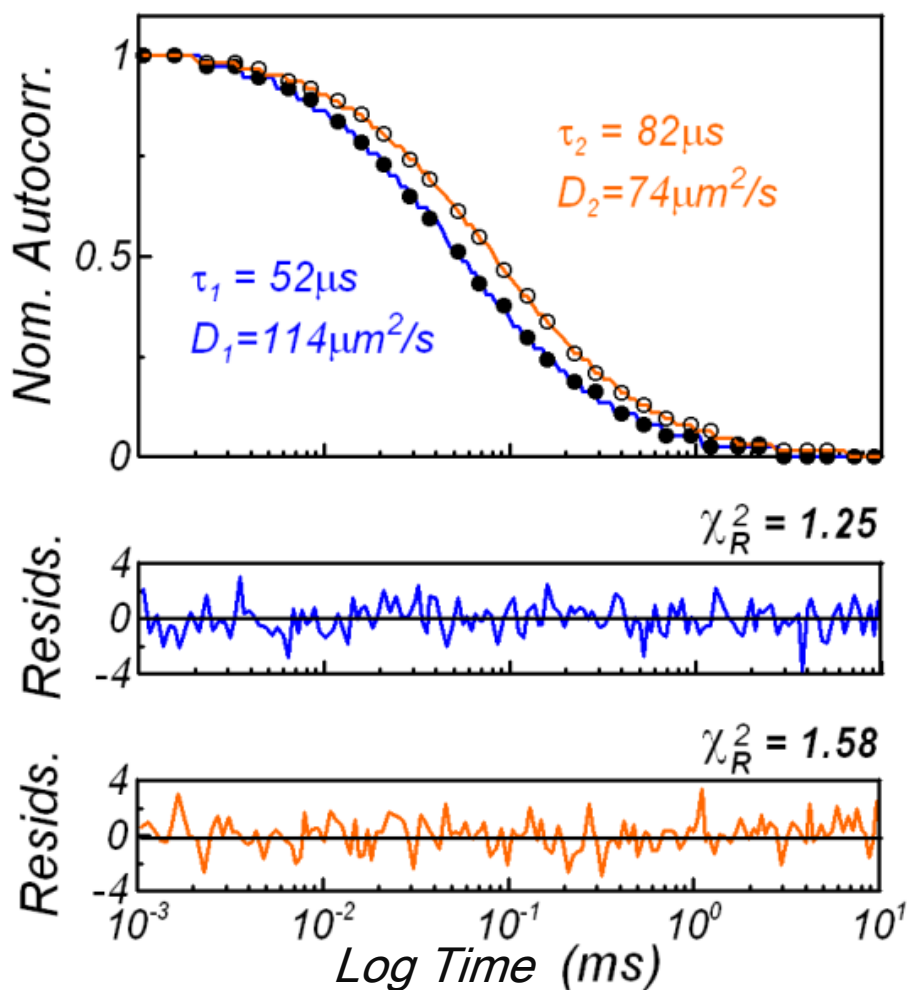


Figura 44. Spettroscopia di Correlazione di Fluorescenza eseguita mediante analisi di “lifetime” sia per la tTG marcata con il DyLight 594 (blu) sia legata agli Ab marcati con il DyLight 649 (rosso). In figura sono inclusi il tempo e il coefficiente di diffusione.

Gli spettri di fluorescenza sono stati registrati utilizzando un diodo laser a lunghezza d'onda di eccitazione di 470 nm che liberava un impulso luminoso ogni 5 minuti. Durante questo intervallo temporale, l'intensità di fluorescenza delle molecole presenti nel volume confocale considerato (0.2 femtolitri), è stata registrata e correlata nel tempo. Utilizzando un così piccolo volume di rilevamento, la fluorescenza di fondo è stata minimizzata, in quanto le molecole fluorescenti contaminanti sono entrate solo raramente nel volume preso in esame. Le fluttuazioni di fluorescenza verificatesi all'interno di tale volume si sono quindi, generate in seguito alle variazioni delle concentrazioni delle sonde fluorescenti,

causate dalla diffusione browniana delle singole molecole in esame. Tali fluttuazioni di fluorescenza sono state analizzate mediante l'utilizzo di un software (SymphoTime) della PicoQuant, Inc., al fine di creare una curva di autocorrelazione che ha permesso di determinare il coefficiente di diffusione e i tempi di diffusione sia per l'antigene tTG in forma libera che nella sua forma legata agli anticorpi policlonali. Da come è possibile vedere in Figura 44 il coefficiente di diffusione (D_1) per la tTG-DyLight 594 libera è pari a $114 \mu\text{m}^2/\text{s}$, mentre il tempo di diffusione (τ_1) di $52 \mu\text{s}$. Dopo l'aggiunta di una soluzione di Ab anti-tTG-DyLight 649 all'antigene appena analizzato, si è registrato un decremento del coefficiente di diffusione (D_2) che risultava di $74 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ed un aumento del tempo di diffusione del campione in esame equivalente a $82 \mu\text{s}$. Da tali dati e dalle curve di autocorrelazione mostrate in Figura 44 è stato possibile concludere che, in seguito all'aggiunta di una soluzione di Ab anti-tTG-DyLight 649, si è instaurato un legame parziale tra gli anticorpi policlonali e l'antigene tTG-DyLight 594 che ha portato, come atteso, ad un aumento dei tempi di diffusione e ad una diminuzione dei coefficienti di diffusione. Ciò si basa sul fatto che aggregati molecolari di dimensioni maggiori, diffondono più lentamente rispetto alle singole molecole biologiche, prese in esame.

4.2.5.2 (Pulse-Interleaved Excitation) Fluorescence Resonance Energy Transfer & Time-Related Single Photon Counting

La determinazione della singola molecola (SMD) diventa un'applicazione molto più efficace quando combinata con il trasferimento di energia di risonanza. Il successivo esperimento da noi eseguito ha previsto la misurazione degli spettri di emissione di fluorescenza di una miscela di molecole proteiche composta dall'antigene gptTG marcato con il donatore DyLight 594 (15 nM) e dagli Ab anti-tTG marcati con il fluoroforo accettore DyLight 649 (1 nM), parzialmente legati alle molecole di antigene marcato. Le molecole di donatore e quelle di accettore sono state eccitate utilizzando impulsi luminosi provenienti da due diodi laser a lunghezze d'onda differenti, ovvero 470 nm per eccitare il donatore e

635 nm per eccitare l'accettore, i quali hanno funzionato in maniera alternata e per piccoli periodi di tempo (PIE: Pulse-Interleaved Excitation).

Negli esperimenti effettuati l'eccitazione diretta dell'accettore ha portato alla determinazione della fluorescenza dei fotoni solo nel canale dell'accettore, laddove l'eccitazione del donatore ha portato alla determinazione della fluorescenza in entrambi i canali dell'accettore e del donatore. I fotoni provenienti dall'eccitazione sia del donatore sia dell'accettore sono stati, inoltre, separati per intervallo temporale basato sul tempo di arrivo dei singoli fotoni. Tale principio, che prende il nome di TCSPC (Time-Correlated Single Photon Counting) ha previsto l'eccitazione della miscela di reazione con un impulso luminoso, risultante in una lunghezza d'onda che è stata poi osservata. L'applicazione di tale principio ha fatto sì che, per un impulso di laser, fosse rilevato un unico fotone. Il tempo misurato tra l'impulso di eccitazione e l'osservazione del fotone è stato in seguito, utilizzato per la costruzione di un istogramma, in cui, l'asse x era rappresentato dall'efficienza di FRET tra la coppia D/A coniugata alle molecole biologiche e l'asse y dal numero di fotoni rilevati nell'unità di tempo considerata (numero di eventi) (Figura 45).

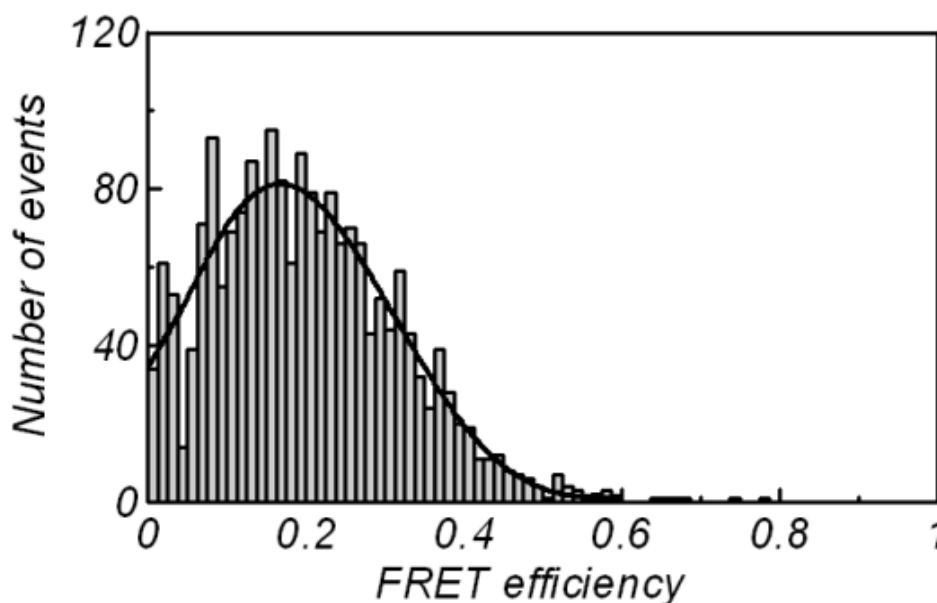


Figura 45. Esempio rappresentativo dell'efficienza di trasferimento dell'energia dal donatore all'accettore in una soluzione composta da 15 nM di D e 1 nM di A.

La reale efficienza di FRET è stata calcolata mediante l'utilizzo del software (SymphoTime) della PicoQuant, Inc., e sfruttando la seguente equazione matematica: $E = (1 + \frac{I_D}{I_A - \chi I_D} \gamma)^{-1}$. I risultati indicano che l'efficienza di trasferimento di energia dal donatore all'accettore era pari a circa il 20%.

In seguito, basandoci sull'efficienza di trasferimento di energia calcolata, abbiamo costruito un secondo istogramma dipendente dalla reale distanza (R_0) tra il donatore e l'accettore, espresso in unità R_0 (Figura 46).

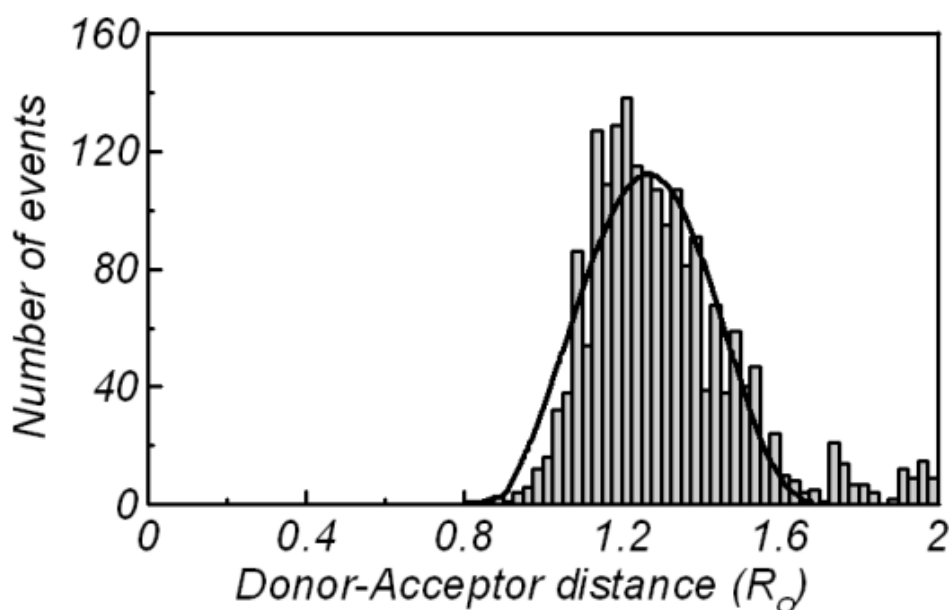


Figura 46. Istogramma della reale distanza (R_0) tra D e A basato sull'efficienza di trasferimento di energia tra D e A ed espresso in unità R_0 .

Dai calcoli effettuati, la reale distanza tra i fluorofori DyLight 594 e 649 coniugati rispettivamente alla tTG e agli Ab anti-tTG risulta pari a 75 Å.

4.2.5.3 Metal-Enhanced Fluorescence & Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy

È stato dimostrato che l'utilizzo di superfici planari costituite da metalli nobili altera le proprietà spettrali dei fluorofori, aumentando la loro emissione di fluorescenza. Tali alterazioni sono, dovute all'interazione delle molecole

fluorescenti con le particelle metalliche vicine. Quest'approccio, è stato scelto nell'ottica di migliorare l'intensità di fluorescenza emessa e la fotostabilità delle molecole fluorescenti coniugate alle molecole di Ag e Ab prese in esame, aumentando quindi la sensibilità della tecnica di SMD. Quindi, al fine di migliorare la registrazione dei segnali di fluorescenza derivanti dallo studio delle singole molecole, sono stati analizzati l'intensità di fluorescenza e il "lifetime" della gptTG-DyLight 594 (1 nM-5 pM), immobilizzata su lastre di vetro presentanti nanostrutture d'argento ramificate (fractal-like structures), prima e dopo aggiunta degli Ab anti-tTG-DyLight 649 (5 pM). I dati sono stati registrati con l'ausilio della Microscopia Confocale, che ha permesso l'acquisizione d'immagini di "lifetime", dove il contrasto nell'immagine era dato da misurazioni di lifetime del campione in esame, in specifiche aree selezionate dall'operatore. Nel nostro caso, le immagini di fluorescenza risolte nel tempo acquisite al microscopio confocale, mediante il metodo a scansione, monitorano un'area dalle dimensioni di 30 x 30 μM e presentano una risoluzione di 0.1 μm . Sono state quindi, acquisite immagini d'intensità di fluorescenza per la gptTG-DyLight 594 concentrata 1 nM e immobilizzata sui vetrini preparati con le nanostrutture d'argento ramificate e immagini di lifetime in SMD per la gptTG-DyLight 594 concentrata 5 pM, immobilizzata su gli stessi supporti ma in presenza di Ab anti-tTG-DyLight 649 (5 pM). In un primo momento, al fine di verificare l'avvenuta immobilizzazione del campione su vetrino, abbiamo esaminato il segnale fluorescente proveniente dall'antigene tTG marcato con il DyLight Fluor 594, depositato sulle nanostrutture di argento ramificate e concentrato 1 nM. Le misure di fluorescenza eseguite sono mostrate in Figura 47 (b), dove è possibile vedere anche un'immagine morfologica delle strutture d'argento ramificate, acquisita nella stessa area in cui è stata misurata la fluorescenza emessa dal donatore (Figura 47 (a)). Abbiamo misurato, prima la luce di fondo diffusa, utilizzando un'eccitazione di 470 nm e un set di filtri (500 longpass e 488 RazorEdge (Semrock)) posizionati d'avanti al detector. In secondo luogo, è stata osservata dallo stesso detector l'emissione di fluorescenza, usando un altro tipo di filtro (530 longwavelength pass). Le due immagini, quella di "scattering" e quella di fluorescenza, sono state registrate in scala e comparate orizzontalmente (Figura 47).

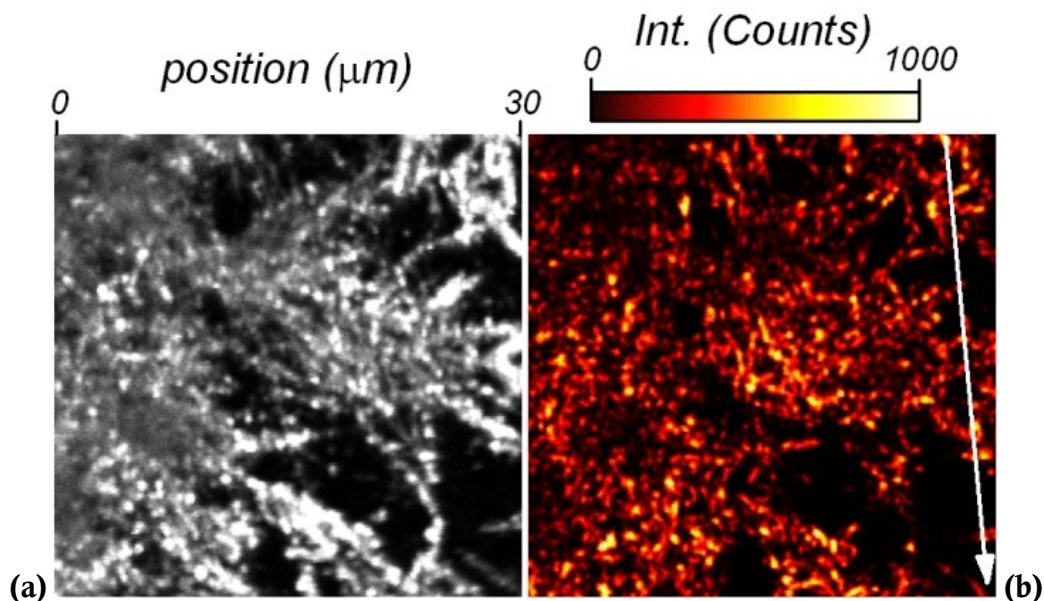


Figura 47. Immagini di Microscopia Confocale a Scansione laser per la tTG-DyLight 594 depositata su vetrino con strutture d'argento ramificate. Il riquadro (a) mostra un'immagine di luce di fondo diffusa che evidenzia la morfologia delle nanostrutture di argento (punti più luminosi), registrata per un'area di $30 \times 30 \mu\text{m}$. Il riquadro (b) presenta un'immagine di fluorescenza della stessa area presentata nel riquadro (a). Il campione immobilizzato ha una concentrazione di 1 nM. L'intensità dei punti luminescenti è stata presentata in una scala di colore da 0 ÷ 1000 conte. Le immagini di fluorescenza sono state registrate utilizzando un potere laser di $8 \mu\text{W}$. I dati acquisiti con l'immagine (a) presentano un'intensità 100 volte inferiore. L'intensità di fluorescenza dovuta alla presenza del donatore (DyLight Fluor 594) è stata misurata considerando l'area sottesa alla freccia bianca mostrata nel riquadro (b).

Le ramificazioni d'argento sono facilmente osservabili, considerando la forma particolare che le caratterizza. Come è possibile vedere, tutti i punti luminescenti sono chiaramente identificati da aree brillanti su un'immagine a fondo scuro, dimostrando che tali punti corrispondono alle nanostrutture d'argento ramificate deposte sulle lastrine di vetro. Per contro, le intensità di fluorescenza più forti sono state osservate nelle aree vicine e sovrapposte alle strutture metalliche d'argento. Inoltre, è stato possibile notare che nessun segnale fluorescente è generato dalle aree non ricoperte dalle nanoparticelle d'argento a prova del fatto che l'interazione di un fluoroforo con una superficie di metallo, induce un aumento della sua emissione di fluorescenza. La Figura 48, invece, presenta la distribuzione delle tracce di intensità e di "lifetime" registrate lungo i punti più luminosi incrociati dalla freccia bianca

tracciata sull'immagine (b) della Figura 47 per la tTG-DyLight 594 deposita sulle strutture d'argento ramificate.

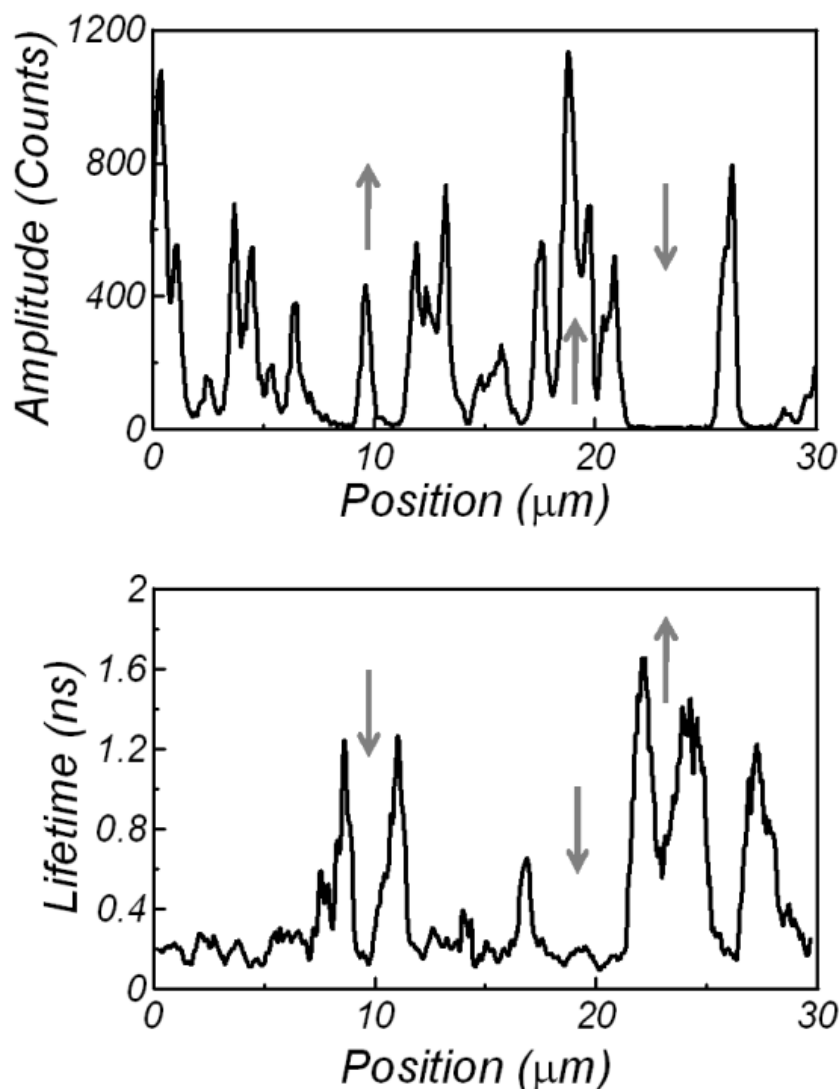


Figura 48. Distribuzioni di intensità di fluorescenza e “lifetime” registrate per i punti sottesi alla freccia bianca mostrata in Figura 47 (b) per la tTG- DyLight 594 depositata sulle nanostrutture d’argento.

Le più forti intensità di fluorescenza (amplitudine) e i più brevi decadimenti di fluorescenza (lifetime) per le singole molecole di fluoroforo sono stati osservati, per l'appunto, nelle aree vicine e sovrapposte alle nanostrutture metalliche. L'intensità di fluorescenza, nei suoi punti più bassi oscilla intorno alle 6 conte, mentre nei punti più alti raggiunge circa le 1200 conte. Oltre all'aumento dell'emissione di fluorescenza, l'interazione fluoroforo-metallo ha causato, quindi, anche un altro

utile effetto, ovvero la diminuzione del lifetime del fluoroforo in esame che ha portato all'aumento della fotostabilità dello stesso. I fluorofori, restando nello stato eccitato per un periodo di tempo più breve, hanno meno probabilità di subire l'effetto di "photo-bleaching".

Confermata l'efficienza del protocollo d'immobilizzazione utilizzato per depositare il nostro antigene marcato con il DyLight 594 sui vetrini con le ramificazioni di argento, abbiamo realizzato nuovi preparati, immobilizzando su vetrino una soluzione di 5 pM di tTG-DyLight 594, che essendo meno concentrata rispetto alla preparazione in precedenza analizzata, ci ha permesso di discriminare con più facilità le singole molecole. Prima di compiere le misure di fluorescenza, i vetrini così preparati sono stati incubati con una soluzione di 5 pM di Ab anti-tTG-DyLight 649. Le immagini di fluorescenza mostrate in Figura 49 sono state registrate ed elaborate analogamente a quanto descritto sopra sia per l'acquisizione delle immagini morfologiche delle strutture d'argento ramificate (Figura 49 A/C), sia per le immagini di "lifetime" a singola molecola della coppia donatore/accettore deposta sulle nanostrutture d'argento (Figura 49 B/D). Il diodo laser utilizzato per le misurazioni di fluorescenza aveva una lunghezza d'onda di eccitazione pari a 470 nm, ma in questo caso, essendo in presenza sia del donatore sia dell'accettore la luce laser è stata separata per entrambe le molecole fluorescenti in due diversi detector. Le misure di "lifetime" a livello di singola molecola sono state registrate soltanto per le molecole di donatore. Il canale dell'accettore, per contro, è stato monitorato per calcolare l'efficienza del trasferimento di energia dal donatore all'accettore (Figure 50-51). Le immagini di "scattering" e di fluorescenza, sono state registrate in scala e comparate orizzontalmente (Figura 49).

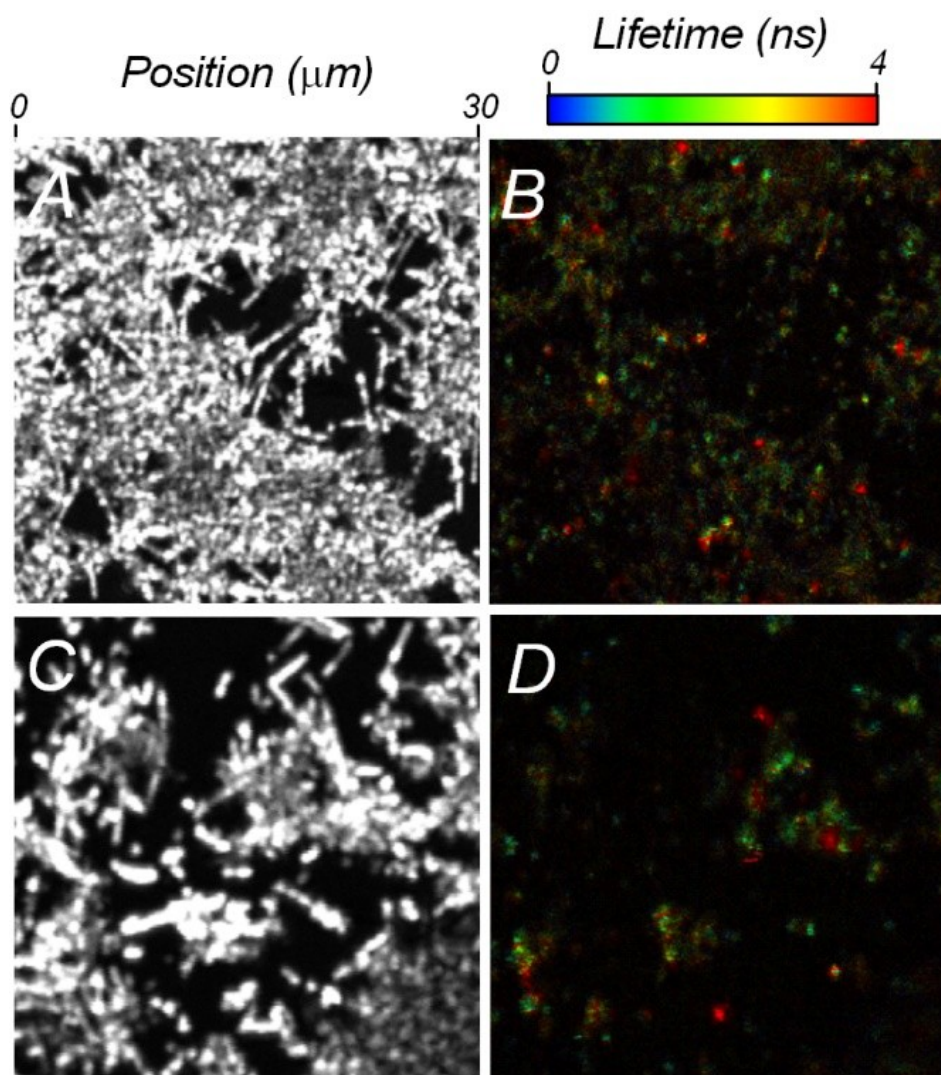


Figura 49. Immagini di Microscopia Confocale a Scansione laser per la tTG-DyLight 594 depositata su vetrino con strutture d'argento ramificate, dopo incubazione con Ab anti-tTG-DyLight 649. I riquadri A/C mostrano immagini di luce di fondo diffusa che evidenziano la morfologia delle nanostrutture d'argento (punti più luminosi), registrate per un'area di $30 \times 30 \mu\text{m}$. I riquadri B/D presentano immagini di "lifetime" delle stesse aree presentate nei riquadri A/C. I campioni immobilizzati hanno una concentrazione di 5pM. L'intensità dei punti luminescenti è stata presentata sotto forma di una scala di colori andanti da 0÷4 nanosecondi. Le immagini di fluorescenza sono state registrate utilizzando un potere laser di $0.4 \mu\text{W}$. I dati acquisiti con le immagini A/C presentano un'intensità 100 volte inferiore. I punti rossi indicano molecole con un decadimento di fluorescenza più lento; i punti verdi indicano molecole con un decadimento di fluorescenza più veloce.

Le immagini B/D mostrano chiaramente la presenza di singoli punti dalla particolare brillantezza nelle aree vicine e sovrastanti le strutture d'argento ramificate, che possiedono dei valori di lifetime caratteristici per le molecole di donatore. In particolare, nella scala di colori fissata in maniera arbitraria, i punti di colore rosso corrispondono a valori di lifetime di circa 4 ns, mentre i punti di colore verde corrispondono a valori di lifetime di circa 2 ns. Tali differenze registrate nei valori di lifetime dei singoli punti, probabilmente sono imputabili al fatto che alcune molecole di donatore (tTG-DyLight 594) non hanno interagito con le molecole di accettore (lifetime maggiore), mentre per altre si è instaurato il legame con le molecole di accettore (Ab anti-tTG-DyLight 649). La determinazione dell'esistenza di legame tra Ag-Ab è stata dunque, provata misurando il lifetime del donatore, che diminuisce in seguito alla FRET verificatasi per l'avvenuto legame con l'accettore.

L'ultimo passaggio sperimentale ha previsto la misurazione dell'intensità di fluorescenza delle singole molecole di donatore (DyLight 594), immobilizzate sulle nanostrutture d'argento, raffigurate nell'immagine precedente da punti di colore rosso brillante. Abbiamo registrato le tracce d'intensità di fluorescenza dipendenti dal tempo per due singole molecole di tTG-DyLight 594 (Figure 50-51 A). In accordo con tali tracce è stato possibile calcolare l'efficienza di energia di trasferimento tra donatore e accettore, che in un caso ha permesso di individuare due istogrammi (Figura 50 B), nell'altro caso uno solo (Figura 51 B). Inoltre, il dato più significativo consiste nel fatto che l'efficienza di FRET registrata per le singole molecole immobilizzate sulle strutture d'argento ramificate, è di gran lunga maggiore, ovvero, pari al 50%, rispetto ai valori ottenuti dagli esperimenti di SMD eseguiti in soluzione mediante applicazione delle metodiche di (PIE)FRET e TCPCS (Figura 45). Tale risultato dimostra che l'utilizzo di superfici planari costituite da metalli nobili determina il cambiamento delle proprietà spettrali dei fluorofori, migliorandone l'intensità di fluorescenza e la fotostabilità. Ciò comporta, quindi, l'aumento della sensibilità della tecnica di SMD.

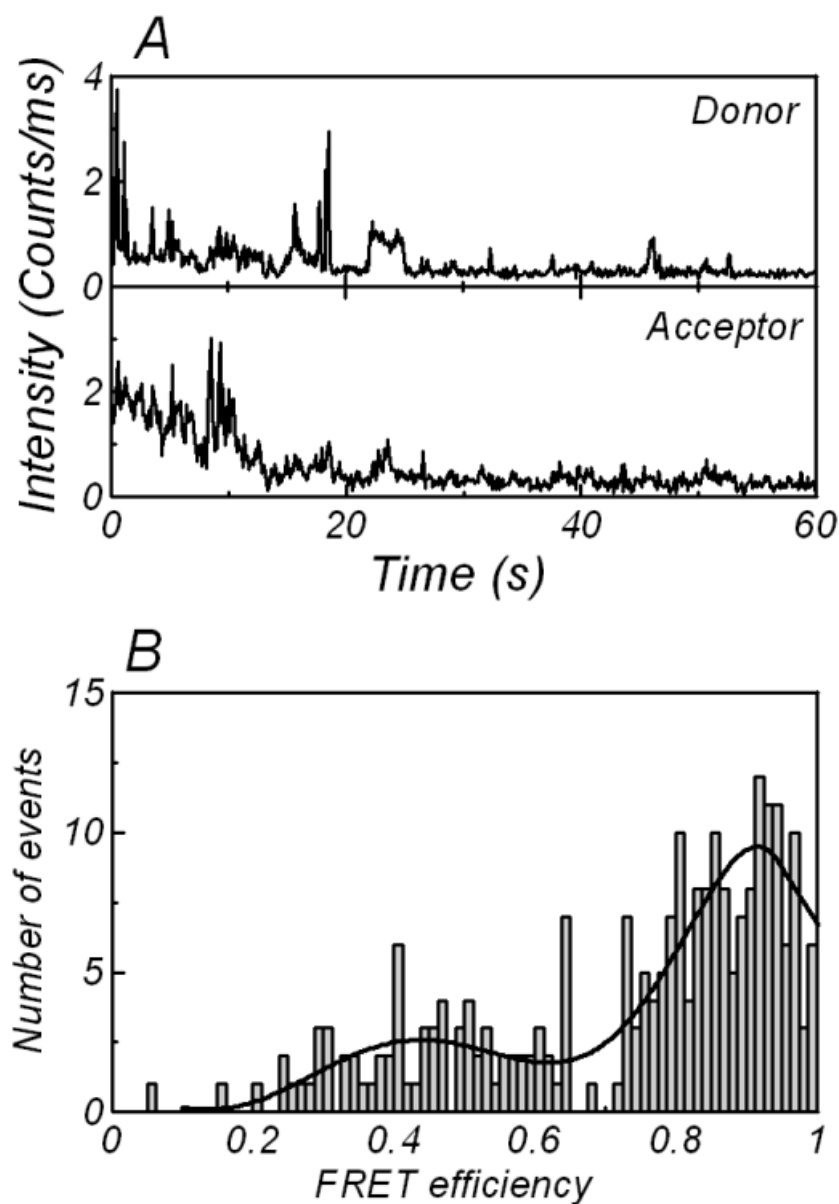


Figura 50. A: esempio rappresentativo di tracce di intensità di fluorescenza in funzione del tempo per singole molecole di DyLight Fluor 594 coniugate alla gptTG, immobilizzata su vetrino con strutture d'argento ramificate. B: esempio rappresentativo dell'efficienza di trasferimento dell'energia dal donatore (DyLight Fluor 594) all'accettore (DyLight Fluor 649) per singole molecole immobilizzate su vetrino in presenza di particelle d'argento.

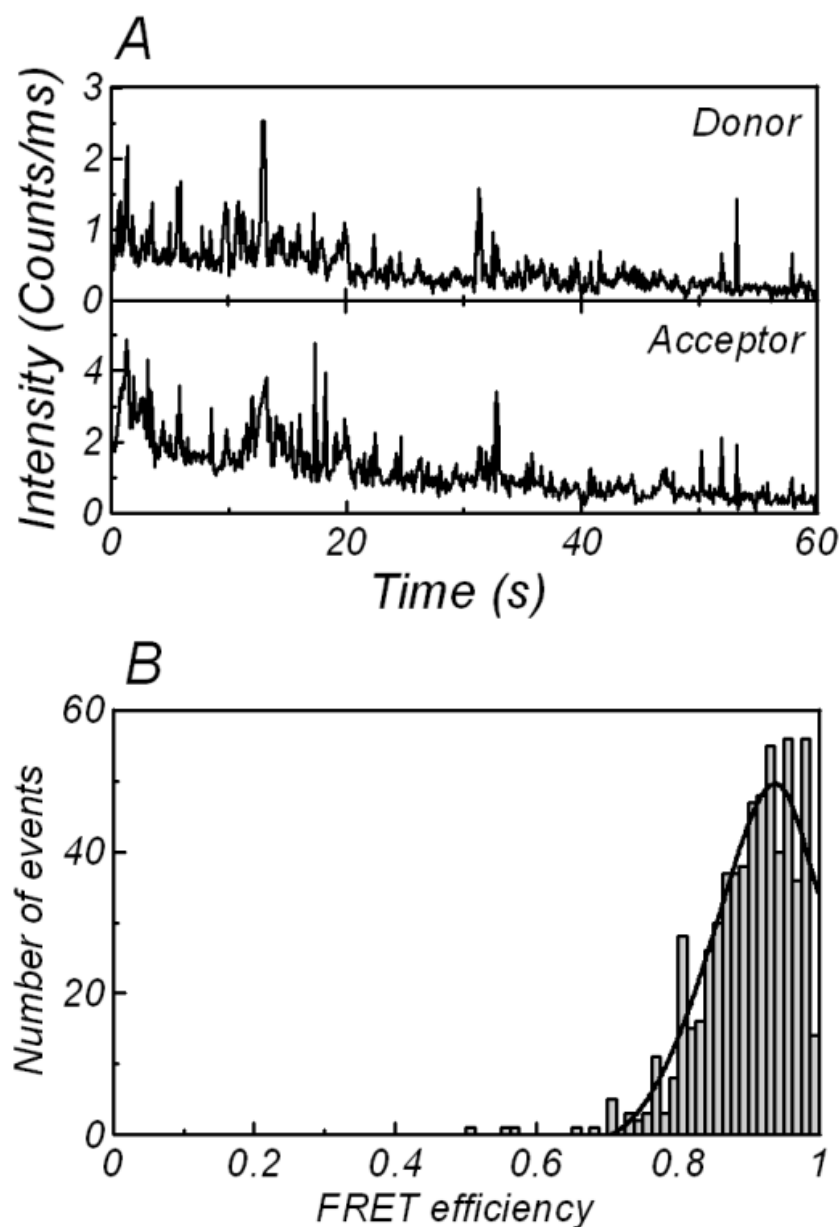


Figura 51. A: esempio rappresentativo di tracce di intensità di fluorescenza in funzione del tempo per singole molecole di DyLight Fluor 594 coniugate alla gptTG, immobilizzata su vetrino con strutture d'argento ramificate. B: esempio rappresentativo dell'efficienza di trasferimento dell'energia dal donatore (DyLight Fluor 594) all'accettore (DyLight Fluor 649) per singole molecole immobilizzate su vetrino in presenza di particelle d'argento.

Capitolo V

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Nel presente progetto di ricerca, è stata proposta una strategia di “immunosensing” innovativa per lo “screening” e il “follow-up” della malattia celiachia. Lo strumento diagnostico descritto è basato sull'utilizzo della transglutaminasi tissutale da cavia e degli anticorpi anti-gpTg da coniglio marcati rispettivamente con le sonde fluorescenti: DyLight Fluor 594 e DyLight Fluor 649. Uno dei principali risultati ottenuti è stato l'individuazione corretta dei fluorofori, che agendo come coppia D/A di energia di trasferimento, si sono rivelati adatti per le analisi FRET proposte. Tuttavia, l'interazione gpTg-DyLight 594/Ab anti-gpTg-DyLight 649 provoca una lieve diminuzione di emissione di fluorescenza da parte del donatore in seguito all'interazione con le molecole di accettore. Questo svantaggio provoca inevitabilmente una perdita di sensibilità del saggio immunoenzimatico a fluorescenza, da noi progettato. Per porre rimedio a ciò, sarà necessario marcare gli anticorpi in prossimità della regione di riconoscimento dell'antigene, selettivamente alle estremità ammino-terminali delle catene leggere e pesanti che li costituiscono. Quest'obiettivo potrebbe essere raggiunto mediante marcatura chimica, che sfrutta particolari condizioni di pH. Infatti, un pH neutro (~ 7.0) dovrebbe favorire la marcatura di una proteina all'estremità N-terminale anche in presenza di residui multipli di lisina, in quanto il pKa delle ammine terminali è inferiore a quello dei gruppi ϵ -amminici delle lisine, da noi utilizzati per la corrente procedura di marcatura degli anticorpi policlonali impiegati negli esperimenti di FRET proposti. In questo modo, il fluoroforo ammino-reattivo DyLight 649 si legherà selettivamente ai gruppi amminici presenti nella forma non protonata presso le estremità N-terminali delle catene polipeptidiche anticorpali, assicurando un rapporto D/A vicino all'unità, importante per una più semplice interpretazione dei dati. In alternativa, poiché la gpTg possiede 18 residui di cisteina, si potrebbe pensare di utilizzare un fluoroforo/“quencher” in forma sulfidril-reattiva per la marcatura dell'antigene in questione. Tuttavia, se tale strategia non comporterà i cambiamenti desiderati nell'emissione di fluorescenza, si potrebbero creare mutanti della gpTg, per singoli residui di cisteina introdotti al posto di un altro residuo

amminoacidico opportunamente selezionato. Con l'ausilio di esperimenti di mutagenesi, dunque, le posizioni amminoacidiche che mostreranno buoni cambiamenti nell'emissione triptofanica, saranno mutate in residui di cisteina da utilizzare per la marcatura. Una volta identificate le opportune posizioni per i fluorofori, si potrà procedere alla preparazione di gptTG mutanti marcate con una sonda fluorescente che funga da accettore nel saggio di FRET.

Al fine di eseguire il saggio fluorescente su campioni di sangue di pazienti celiaci, mediante eccitazione laser che induce la formazione di un'onda evanescente sulla superficie del campione in esame, è importante considerare la perdita di sensibilità che potrebbe derivarne. Infatti, limitando il volume di eccitazione del campione solo alla superficie, al fine di diminuire la distorsione spettrale che avviene in campioni molto concentrati e opachi, il numero di fluorofori eccitati in soluzione sarà inevitabilmente ridotto. È stato osservato, però, che le proprietà spettrali dei fluorofori possono cambiare radicalmente quando si trovano in prossimità di una superficie metallica, in genere entro i 200 Å. In particolare, sembra che i principali effetti della vicinanza delle particelle metalliche sono rappresentati dalla variazione della resa quantica, del lifetime, e della velocità di decadimento radiativo e non radiativo di un fluoroforo. Perciò, la tecnica di fluorescenza aumentata dai metalli (MEF), nel nostro caso rappresentati da nanostrutture d'argento ramificate, depositate su vetrino, è stata utilizzata per migliorare il rapporto segnale/rumore di fondo per la rilevazione quantitativa del bioanalita d'interesse. In tutti i test da noi eseguiti, sono stati registrati buoni segnali di fluorescenza provenienti da singole molecole di DyLight Fluor 594 coniugato alle molecole di gptTG, depositate sulle strutture d'argento ramificate. Siamo riusciti dunque, a ottenere una buona separazione tra i fluorofori e delle soddisfacenti misure a livello di singola molecola, applicando concentrazioni picomolari di proteina marcata. Sono state registrate notevoli differenze d'intensità di fluorescenza quando le sonde fluorescenti sono state collocate a maggiore distanza dalle nanostrutture d'argento. Infatti, il confronto tra le intensità dei punti luminosi sulle aree prive di particelle d'argento e sulle superfici metalliche ha suggerito che nanostrutture d'argento ramificate migliorano l'emissione di fluorescenza da 100 a 300 volte. I nostri risultati dunque, hanno fornito una prova di maggiore stabilità delle sonde fluorescenti in presenza di superfici metalliche. Infine, il confronto tra le immagini

di fluorescenza emessa e quelle di “scattering” mostra chiaramente che le nanoparticelle d’argento sono responsabili del miglioramento del segnale emesso dai campioni analizzati.

Nel presente lavoro è stato anche dimostrato che il test immunoenzimatico potrebbe essere eseguito in modo competitivo, al fine di ottenere informazioni quantitative più affidabili. Perciò, la produzione di specifici anticorpi monoclonali anti-tTG potrebbe essere utile per la standardizzazione dell’analisi.

Per quanto riguarda la produzione rapida e a basso costo del gptTG ricombinante, altri studi sono necessari per ottimizzare le condizioni di espressione della proteina nel ceppo batterico di *E. coli*. L’uso di sorbitolo e betaina come chaperoni chimici hanno aumentato leggermente la resa quantica di enzima solubile. Tuttavia, la quantità di tTG ricombinante solubile prodotta non è stata sufficiente per svolgere successive indagini. La combinazione dello stress osmotico con lo shock termico potrebbe rappresentare una strategia utile per aumentare la concentrazione endogena di chaperoni molecolari, che hanno il compito di assistere le proteine nel corretto ripiegamento della loro struttura e che nel nostro caso sono stati insufficienti. Inoltre, anche la co-sovraespressione di chaperoni molecolari esogeni, come GroEL, DNA K e DNA J, potrebbe essere una buona strategia, per ottenere elevate quantità di proteina solubile ricombinante in ceppi di cellule procariote. Ottenuta una buona resa di gptTG solubile, la proteina potrà essere sottoposta a un rapido protocollo di purificazione mediante l’utilizzo del sistema di IMAC (cromatografia d’affinità che prevede l’immobilizzazione di ioni-metallici sulla resina d’interesse -Ni-NTA-). Una caratterizzazione strutturale e funzionale della proteina ricombinante sarà, poi, effettuata al fine di verificare la stabilità del prodotto. Infine, ottenuto l’antigene ricombinante, diversi saggi ELISA competitivi possono essere effettuati per delineare le migliori condizioni per la definizione del saggio immunologico. L’analisi sarà mirata a definire la concentrazione di antigene da utilizzare, le quantità di anticorpo competitore anti-gptTG e le diluizioni appropriate di campione, condizioni che saranno trasferite nel biosensore proteico a fluorescenza. Tutto ciò, al fine di trasferire la tecnologia nel settore della diagnostica clinica, in quanto, lo sviluppo di un nuovo biosensore sarà vantaggioso solo se il suo utilizzo avrà come fine ultimo il miglioramento della salute dell’uomo.

BIBLIOGRAFIA

Akimov SS, Krylov D, Fleischman LF, Belkin AM. Tissue transglutaminase is an integrin-binding adhesion coreceptor for fibronectin. *J Cell Biol*, 148:825-838 (2000).

Akimov SS, Belkin AM. Cell surface tissue transglutaminase is involved in adhesion and migration of monocytic cells on fibronectin. *Blood*; 98:1567-1576 (2001).

American Gastroenterological Association (AGA). Institute Medical Position Statement on the diagnosis and management of celiac disease.

Arentz-Hansen H, Korner R, Molberg O, Quarsten H, Vader W, Kooy YMC, Lundin KEA, Koning F, Roepstorff P, Sollid LM, McAdam SN. The intestinal T cell response to a-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J Exp Med*; 191:603-612 (2000).

Arentz-Hansen H, McAdam SN, Molberg O, Fleckenstein B, Lundin KE, Jorgensen TJ, Jung G, Roepstorff P, Sollid LM. Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology*; 123:803-809 (2002).

Arentz-Hansen H, Fleckenstein B, Molberg O, Scott H, Koning F, Jung G, Roepstorff P, Lundin KEA, Sollid LM. The molecular basis for oat intolerance in patients with celiac disease. *PLoS Med*; 1:e1 (2004).

Auricchio S, Greco L, Troncone R. Gluten-sensitive enteropathy in childhood. *Pediatr.Clin.North Am.*; 35:157-87 (1988).

Autuori F, Farrace MG, Oliverio S, Piredda L, Piacentini M. Tissue transglutaminase and apoptosis. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*; 62:129-36 (1998).

Bardella MT, Minoli D, Ravizza G, Radaelli F, Velio P, Quatrini M, Bianchi PA, Conti D. Increased prevalence of celiac disease in patients with dyspepsia. *Arch Intern Med.*; 160:1489-1491 (2000).

Benahmed M, Meresse B, Arnulf B, Barbe U, Mention JJ, Verkarre V, Allez M, Cellier C, Hermine O, Cerf-Bensussan N. Inhibition of TGF-beta signaling by IL-15: a new role for IL-15 in the loss of immune homeostasis in celiac disease. *Gastroenterology*; 132: 994-1008 (2007).

Bergseng E, Sidney J, Sette A, Sollid LM. Analysis of the binding of gluten T-cell epitopes to various human leukocyte antigen class II molecules. *Hum Immunol*; 69:94-100 (2008).

Bernardo D, Garrote JA, Allegretti Y, León A, Gómez E, Bermejo-Martin JF, Calvo C, Riestra S, Fernández-Salazar L, Blanco-Quirós A, Chirido F, Arranz E. Higher constitutive IL15R alpha expression and lower IL-15 response threshold in coeliac disease patients. *Clin Exp Immunol*; 154:64-73 (2008).

Bethune MT & Khosla C. Parallels between pathogens and gluten peptides in celiac sprue. *PLoS Pathog.*; 4, e34 (2008).

Bhagat G, Naiyer AJ, Shah JG, Harper J, Jabri B, Wang TC, Green PH, Manavalan JS. Small intestinal CD8+TCR gamma/delta NKG2A intraepithelial lymphocytes have attributes of regulatory cells in patients with celiac disease. *J Clin Invest*; 118:281-293 (2008).

Bonamico M, Ferri M, Nenna R, Verrienti A, Di Mario U, Tiberti C. Tissue transglutaminase autoantibody detection in human saliva: a powerful method for celiac disease screening. *J Pediatr*; 144: 632-6 (2004).

Bottaro G, Failla P, Rotolo N, Sanfilippo G, Azzaro F, Spina M, Patane R. Changes in coeliac disease behaviour over the years. *Acta Paediatr.*; 82(6-7):566-8 (1993).

Boudraa G, Hachelaf W, Benbouabdellah M, Beikadi M, Benmansour FZ, Touhami M. Prevalence of celiac disease in diabetic children and their first-degree relatives in West Algeria: screening with serological markers. *Acta Paediatr*; 412:58-60 (1996).

Blackwell JR, Horgan R. A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS Lett.*; 295(1-3):10-2 (1991).

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*; 72:248-54 (1976).

Burgess SJ, Maasho K, Masilamani M, Narayanan S, Borrego F, Coligan JE. The NKG2D receptor: immunobiology and clinical implications. *Immunol Res*; 40:18-34 (2008).

Burgin-Wolff A, Gaze H, Hadziselimovic F, Huber H, Lentze MJ, Nusslé D, Reymond-Berthet C. Antigliadin and antiendomysium antibody determination for celiac disease. *Arch Dis Child*; 65: 909-11 (1990).

Burgin-Wolff A, Dahlbom I, Hadziselimovic F, Petersson CJ. Antibodies against human tissue transglutaminase and endomysium in diagnosing and monitoring coeliac disease. *Scand J Gastroenterol*; 37(6): 685-691 (2002).

Card TR, West J, Holmes GK. Risk of malignancy in diagnosed celiac disease: A 24-year prospective, population-based, cohort study. *Aliment Pharmacol Ther.*; 20:769-775 (2004).

Carter C, Sheldon W & Walker C. The inheritance of coeliac disease. *Ann. Hum. Genet.* 23, 266-278 (1959).

Catassi C, Raetsch IM, Gandolfi L, Pratesi R, Fabiani E, El Asmar R, et al. Why is coeliac disease endemic in the people of the Sahara? *Lancet*; 354: 647-8 (1999).

Chand N & Mihas A. Celiac disease: Current concepts in diagnosis and treatment. *J Clin Gastroenterol*; 40:3-14 (2006).

Cheroutre H. In IBD eight can come before four. *Gastroenterology*; 131:667-670 (2006).

Chiba H, Kojima T, Osanai M, Sawada N. The significance of interferon-g-triggered internalization of tight-junction proteins in inflammatory bowel disease. *Sci STKE*; 2006:e1 (2006).

Choi K, Siegel M, Piper JL, Yuan L, Cho E, Strnad P, Omary B, Rich KM, Khosla C. Chemistry and biology of dihydroisoxazole derivatives: selective inhibitors of human transglutaminase 2. *Chem.Biol.*; 12,469-475 (2005).

Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Parroni R, D'alò S, Pistoia MA, Doglioni C, Cifone MG, Corazza GR. Cytolytic mechanisms of intraepithelial lymphocytes in coeliac disease (CoD). *Clin Exp Immunol*; 120:235-240 (2000).

Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Bauer M, Della Riccia DN, Bizzini F, Biagi F, Cifone MG, Corazza GR, Schuppan D. Matrix metalloproteinase pattern in celiac duodenal mucosa. *Lab Invest*; 85:397-407 (2005).

Ciclitira PJ. AGA Technical Review on Celiac Sprue. *Gastroenterology*; 120:1526–1540 (2001).

Ciclitira PJ, Johnson MW, Dewar DH, Ellis HJ. The pathogenesis of celiac disease. *Mol Aspects Med.*; 26:421-458 (2005).

Cinova J, Palova-Jelinkova L, Smythies LE, Cerná M, Pecharová B, Dvůrák M, Fruhauf P, Tlaskalová-Hogenová H, Smith PD, Tucková L. Gliadin peptides activate blood monocytes from patients with celiac disease. *J Clin Immunol*; 27:201-209 (2007).

Clemente MG, De Virgiliis S, Kang JS, Macatagney R, Musu MP, Di Pierro MR, Drago S, Congia M, Fasano A. Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut*; 52:218-223 (2003).

Collin P, Kaukinen K, Valimäki M, Salmi J. Endocrinological disorders and celiac disease. *Endocr Rev.*; 23:464-483 (2002).

Corazza GR, Valentini RA, Frisoni M, et al. Gliadin immune reactivity is associated with overt and latent enteropathy in relatives of celiac patients. *Gastroenterology*; 103:1517 (1992).

Counsell CE, Taha A, Ruddell WS. Coeliac disease and autoimmune thyroid disease. *Gut*; 35:844-846 (1994).

D'Amico MA, Holmes J, Stavropoulos SN, Frederick M, Levy J, DeFelice A, Kazlow P, Green PH. Presentation of pediatric celiac disease in the United States: Prominent effect of breastfeeding. *Clin Pediatr.*; 44:249-258 (2005).

Daum S, Bauer U, Foss HD, Schuppan D, Stein H, Riecken EO, Ullrich R. Increased expression of mRNA for matrix metalloproteinases-1 and -3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in intestinal biopsy specimens from patients with coeliac disease. *Gut*; 44:17-25 (1999).

De Ritis G, Auricchio S, Jones HW, Lew EJ-L, Bernardin JE, Kasarda DD. In vitro (organ culture) studies of the toxicity of specific A-gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology*; 94:41-49 (1988).

De Vitis I, Ghirlanda G, Gasbarrini G. Prevalence of coeliac disease in type 1 diabetes: a multicentre study. *Acta Paediatr Suppl*; 412, 56-57 (1996).

Dewar D, Pereira SP, Ciclitira PJ. The pathogenesis of coeliac disease. *Int J Biochem Cell Biol*; 36, 17-24 (2004).

Dewar DH, Ciclitira PL. Clinical features and diagnosis of celiac disease. *Gastroenterology*; 128(suppl 1):S19-S24 (2005).

Dicke WK, Weijers NA, van der Kamer JH. Coeliac disease. The presence in wheat of a factor having a deliterious effect in cases of coeliac disease. *Acta Paediatr*; 42:34-42 (1953).

Dickey W, Hughes DF, McMillan SA. Disappearance Of Endomysial Antibodies In Treated Celiac Disease Does Not Indicate Histological Recovery. *Am J Gastroenterol*; 95:712-714 (2000).

Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med*; 3:797-801 (1997).

Dieterich W, Laag E, Schopper H, Volta U, Ferguson A, Gillet H, Riecken EO, Schuppan D. Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. *Gastroenterology*; 115: 1317-1321 (1998).

Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Cupelli F, Cinque B, Millimaggi D, Clarkson MM, Paulli M, Cifone MG, Corazza GR. Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease. *Gut*; 55:469-477 (2006).

Di Sabatino A, Pickard KM, Gordon JN, Salvati V, Mazzarella G, Beattie RM, Vossenkaemper A, Rovedatti L, Leakey NA, Croft NM, Troncone R, Corazza GR, Stagg AJ, Monteleone G, MacDonald TT. Evidence for the role of interferon-alfa production by dendritic cells in the Th1 response in celiac disease . *Gastroenterology*; 133,1175-1187 (2007).

Dørum S, Qiao SW, Sollid LM, Fleckenstein B. Quantification of transglutaminase 2-mediated deamidation of gluten peptides by mass spectrometry. *J Proteome Res*;8 (2009).

Dubois PC & van Heel DA. Translational mini-review series on the immunogenetics of gut disease: immunogenetics of coeliac disease. *Clin. Exp. Immunol*; 153,162-173 (2008).

Ebert EC. IL-15 converts human intestinal intraepithelial lymphocytes to CD94 producers of IFN-gamma and IL-10, the latter promoting Fas ligand-mediated cytotoxicity. *Immunology*; 115(1):118-26 (2005).

Falchuk ZM, Rogentine GN, Strober W. Predominance of histocompatibility antigen HL-A8 in patients with gluten-sensitive enteropathy. *The Journal of Clinical Investigation*; 51(6):1602-5 (1972).

Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: An evolving spectrum. *Gastroenterology*; 120:636-651 (2001).

Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S, Elitsur Y, Green PH, Guandalini S, Hill ID, Pietzak M, Ventura A, Thorpe M, Kryszczak D, Fornoroli F, Wasserman SS, Marray JA, Horvath K. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: A large multicenter study. *Arch Intern Med.*; 163:286-292 (2003).

Fasano A. Clinical presentation of celiac disease in the pediatric population. *Gastroenterology*; 128(suppl 1):S68-S73 (2005).

Ferguson A & Murray D. Quantization of intraepithelial lymphocytes in human jejunum. *Gut*; 12,988-994 (1971).

Ferreira M, Lloyd Davies S, Butler M, Scott S, Clark M, Kumar P. Endomysial antibody: is it the best screening test for celiac disease? *Gut*; 33:1633-1637 (1992).

Fesus L & Piacentini M. Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions . *Trends Biochem. Sci.*; 27, 534-539 (2002).

Fleckenstein B, Molberg O, Qiao SW, Schmid DG, der Mulbe F, Elgstoen K, Jung G, Sollid LM. Gliadin T cell epitope selection by tissue transglutaminase in celiac disease. *J Biol Chem*; 277:34109-34116 (2002).

Folk JE & Cole PW. Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase. I. Purification and properties of the enzyme: identification of a functional cysteine essential for activity. *J Biol Chem.*; 241(23):5518-25 (1966).

Forsberg G, Hernell O, Melgar S, Israelsson A, Hammarström S, Hammarström ML. Paradoxical coexpression of proinflammatory and down-regulatory cytokines in intestinal T cells in childhood celiac disease. *Gastroenterology*; 123:667-678 (2002).

Frazer AC, Fletcher RF, Ross CAS, Shaw B, Sammons HG, Schneider R. Gluten-induced enteropathy. The effect of partially digested gluten. *Lancet*; 2:252-255 (1959).

Frisullo G, Nociti V, Iorio R, Patanella AK, Marti A, Assunta B, Plantone D, Cammarota G, Tonali PA, Batocchi AP. Increased CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells in peripheral blood of celiac disease patients: correlation with dietary treatment. *Hum Immunol*; 70:430-435 (2009).

Fry L. Dermatitis herpetiformis: Problems, progress and prospects. *Eur J Dermatol.*; 12:523-531 (2002).

Gass J, Bethune MT, Siegel M, Spencer A & Khosla C. Combination enzyme therapy for gastric digestion of dietary gluten in patients with celiac sprue. *Gastroenterology*; 133:472-480 (2007).

Gianfrani C, Levings MK, Sartirana C, Mazzarella G, Barba G, Zanzi D, Camarca A, Iaquinto G, Giardullo N, Auricchio S, Troncone R, Roncarolo MG. Gliadin-specific type 1 regulatory T cells from the intestinal mucosa of treated celiac patients inhibit pathogenic T cells. *J Immunol*; 177:4178-4186 (2006).

Gillet SM, Chica RA, Keillor JW, Pelletier JN. Expression and rapid purification of highly active hexahistidine-tagged guinea pig liver transglutaminase. *Protein Expr Purif.* Feb; 33(2):256-64 (2004).

Gjertsen HA, Lundin KEA, Sollid LM, Eriksen JA, Thorsby E. T-cells recognize a peptide derived from a-gliadin presented by the celiac disease associated HLA-DQ (a1*0501, b1*0201) heterodimer. *Hum Immunol*; 39:243-252 (1994).

Goggins M & Kelleher D. Celiac Disease and other Nutrient Relate Injuries to the Gastrointestinal Tract. *The American Journal of Gastroenterology*; 89(8):S2-S17 (1994).

Graham A. Heap, David A. van Heel. Genetics and pathogenesis of coeliac disease. *Seminars in Immunology* 21; 346-354 (2009).

Greco L, Romino R, Coto I Di Cosmo N, Percopo S, Maglio M, Paparo F, Gasperi V, Limongelli MG, Cotichini R, D'Agate C, Tinto N, Sacchetti L, Tosi R, Stazi MA. The first large population based twin study of celiac disease. *Gut*; 50,624-628 (2002).

Green PH, Shane E, Rotterdam H, Forde KA, Grossbard L. Significance of unsuspected celiac disease detected at endoscopy. *Gastrointest Endosc.*; 51:60-65 (2000).

Green PHR, Stavropoulos SN, Panagi SG, Goldstein SL, McMahon DJ, Absan H, Neugut AI. Characteristics of adult celiac disease in the USA: Results of a national survey. *Am J Gastroenterol.*; 96:126-131 (2001).

Green PH & Jabri B. Celiac disease. *Lancet.*; 362:383-391 (2003).

Green PH. The many faces of celiac disease: Clinical presentation of celiac disease in the adult population. *Gastroenterology*; 128(suppl 1):S74-S78 (2005).

Greenberg CS, Birckbichler PJ, Rice RH. Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *Faseb Journal*; 5(15):3071-7 (1991).

Gryczynski Z & Bucci E. A new front-face optical cell for measuring weak fluorescent emissions with time resolution in the picosecond time scale. *Biophys Chem. Nov*; 48(1):31-8 (1993).

Guy-Grand D, Disanto JP, Henchoz P, Malassis-Seris M & Vassalli P. Small bowel enteropathy-role of intraepithelial lymphocytes and of cytokines (IL-12, IFN γ , TNF) in the induction of epithelial cell death and renewal. *Eur. J. Immunol.*; 28,730-744 (1998).

Hakanen M, Luotola K, Salmi J, Laippala P, Kaukinen K, Collin P. Clinical and subclinical autoimmune thyroid disease in adult coeliac disease. *Dig Dis Sci*; 46,2631-2635 (2001).

Harris KM, Fasano A, Mann DL. Cutting Edge. IL-1 controls the IL-23 response induced by gliadin, the etiologic agent in celiac disease. *Journal of Immunology*; 181(7):4457-60 (2008).

Hausch F, Halttunen T, Maki M & Khosla C. Design, synthesis, and evaluation of gluten peptide analogs as selective inhibitors of human tissue transglutaminase . *Chem. Biol.*; 10,225-231 (2003).

Hekkens WJM, Haex AJ, Willihager RGJ. Some aspects of gliadin fractionation and testing by histochemical methods. In: Booth CC, Dowling RH, eds. *Coeliac disease*. Edinburgh, Churchill Livingstone,11-19; (1970).

Henderson KN, Reid HH, Borg NA, Broughton SE, Huyton T, Anderson RP, McCluskey J, Rossjohn J. The production and crystallization of the human leukocyte antigen class II molecules HLA-DQ2 and HLA-DQ8 complexed with deamidated gliadin peptides implicated in coeliac disease. *Acta Crystallographica*; 63(Pt 12):1021-5 (2007).

Henderson KN, Tye-Din JA, Reid HH, Chen Z, Borg NA, Beissbarth T, Tatham A, Mannering SI, Purcell AW, Dudek NL, van Heel DA, McCluskey J, Rossjohn J, Anderson RP. A structural and immunological basis for the role of human leukocyte antigen DQ8 in celiac disease. *Immunity*; 27:23-34 (2007).

Hin H, Bird G, Fisher P, Mahy N, Jewell D. Coeliac disease in primary care: a case finding study. *BMJ*; 318:164-167 (1999).

Howell MD, Austin RK, Kelleher D, Nepom GT & Kagnoff MF. An HLA-D region restriction fragment length polymorphism associated with celiac disease. *J. Exp. Med.*; 164,333-338 (1986).

Hue S, Mention JJ, Monteiro RC, Zhang S, Cellier C, Schmitz J, Verkarre V, Fodil N, Bahram S, Cerf-Bensussan N, Caillat-Zucman S. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity*; 21:367-377 (2004).

Hull R. Rheumatoid arthritis and celiac disease. *Lancet.*; 1:330 (1989).

Hunt KA, Zhernakova A, Turner G, Heap GA, Franke L, Bruinenberg M, Romanos J, Dinesen LC, Ryan AW, Panesar D, Gwilliam R, Takeuchi F, McLaren WM, Holmes GK, Howdle PD, Walters JR, Sanders DS, Playford RJ, Trynka G, Mulder CJ, Mearin ML, Verbeek WH, Trimble V, Stevens FM, O'Morain C, Kennedy NP, Kelleher D, Pennington DJ, Strachan DP, McArdle WL, Mein CA, Wapenaar MC, Deloukas P, McGinnis R, McManus R, Wijmenga C, van Heel DA. Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response. *Nat. Genet.*; 40,395-402 (2008).

Ikura K, Nasu T, Yokota H, Tsuchiya Y, Sasaki R, Chiba H. Amino acid sequence of guinea pig liver transglutaminase from its cDNA sequence. *Biochemistry*. Apr; 19,27(8):2898-905 (1988).

Ikura K, Tsuchiya Y, Sasaki R, Chiba H. Expression of guinea-pig liver transglutaminase cDNA in *Escherichia coli*. Amino-terminal N alpha-acetyl group is not essential for catalytic function of transglutaminase. *Eur J Biochem.*; 187(3):705-11 (1990).

Israel EJ, Taylor S, Wu Z, Mizoguchi E, Blumberg RS, Bhan A, Simister NE. Expression of the neonatal Fc receptor, FcRn, on human intestinal epithelial cells. *Immunology*; 92:69-74 (1997).

Ivarsson A, Hernell O, Stenlund H, Persson LA. Breast-feeding protects against celiac disease. *Am J Clin Nutr.*; 75:914-921 (2002).

Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu Rev Immunol*; 27:313-338 (2009).

Jabri B, de Serre NP, Cellier C, Evans K, Gache C, Carvalho C, Mougenot JF, Allez M, Jian R, Desreumaux P, Colombel JF, Matuchansky C, Cugnenc H, Lopez-Botet M, Vivier E, Moretta A, Roberts AI, Ebert EC, Guy-Grand D, Brousse N, Schmitz J, Cerf-Bensussan N. Selective expansion of intraepithelial lymphocytes expressing the HLA-E-specific natural killer receptor CD94 in celiac disease. *Gastroenterology*; 118:867-879 (2000).

John S. Leeds, Andrew D. Hopper, and David S. Sanders. Coeliac disease. *British Medical Bulletin*; 88: 157-170 (2008).

Jones RA, Nicholas B, Mian S, Davies PJ, Griffin M. Reduced expression of tissue transglutaminase in a human endothelial cell line leads to changes in cell spreading, cell adhesion and reduced polymerisation of fibronectin. *Journal of Cell Science*; 110(Pt 19):2461-72 (1997).

Jones RB, Robins GG, Howdle PD. Advances in celiac disease. *Curr Opin Gastroenterol.*; 22:117-123 (2006).

Junker Y, Leffler DA, Wieser H, et al. Gliadin activates monocytes, macrophages and dendritic cells in vitro and in vivo via Toll like receptor 4. *Gastroenterology*; 36(Suppl 1):M2022 (2009).

Kagnoff MF, Raleigh KA, Hubert JJ, Bernardin JE, Kasarda DD. Possible role for a human adenovirus in the pathogenesis of coeliac disease. *J Exp Med*; 160:1544-1557 (1984).

Kagnoff MF, Paterson NY, Kumar PJ, Kasarda DD, Carbone FR, Unsworth DJ, Austin RK. Evidence for the role of a human intestinal adenovirus in the pathogenesis of celiac disease. *Gut*; 28:995-1001 (1987).

Kapoerchan VV Wiesner M, Overhand M, van der Marel GA, Koning F, Overkleeft HS. Design of azidoproline containing gluten peptides to suppress CD4+ T-cell responses associated with celiac disease. *Bioorg. Med. Chem.*; 16, 2053-2062 (2008).

Karell K, Louka AS, Moodie SJ, Ascher H, Clot F, Greco L, Ciclitira PJ, Sollid LM, Partanen J. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Human Immunology*; 64(4):469-77 (2003).

Kasarda DD, Okita TW, Bernardin JE, Backer PA, Nimmo C, Lew E, Dictler MD, Green FC. Nucleic acid (cDNA) and amino acid sequences of α -type gliadins from wheat (*Triticum Aestivum*). *Proc Natl Acad Sci U S A*; 87:4712-4716 (1984).

Kaukinen K, Halme L, Collin P. Celiac disease: Gluten-free diet may reverse hepatic failure. *Gastroenterology*; 122:881-888 (2002).

Kelly J, Weir DG, Feighery C. Differential expression of HLA-D gene products in the normal and coeliac small bowel. *Tissue Antigens*; 31:151-160 (1988).

Keuning JJ, Pena AS, van Leeuwen A, van Hooff JP, van Rood JJ. HLA-DW3 associated with coeliac disease. *Lancet*; 1(7958):506-8 (1976).

Kiln G, Holmes GKT, Cooper BT, Thompson H, Allan RN. Association of coeliac disease and inflammatory bowel disease. *Gut*; 21:636-641 (1980).

Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2^a ed. Springer, 1999.

Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3^a ed. Springer, 2006.

Ladinser B, Rossipal E, Pittschieler K. Endomysium antibodies in celiac disease: an improved method. *Gut*; 35:776-8 (1994).

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227(5259):680-5 (1970).

Lammers KM, Lu R, Brownley J, Lu B, Gerard C, Thomas K, Rallabhandi P, Shea-Donohue T, Tamiz A, Alkan S, Netzel-Arnett S, Antalis T, Vogel SN, Fasano A. Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology*; 135(1):194-204 e3 (2008).

Leffler D, Saha S, Farrell RJ. Celiac disease. *Am J Manag Care.*; 9:825-831 (2003).

Lerner A, Kumar V, Iancu TC. Immunological diagnosis of childhood coeliac disease: comparison between antigliadin, antireticulin and antiendomysial antibodies. *Clin Exp Immunol*; 95:78-82 (1994).

Littlewood JM, Crollick AJ, Richards DG. Childhood celiac disease is disappearing. *Lancet*; II: 1359 (1980).

Londei M, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Quaratino S, Maiuri L. Gliadin as a stimulator of innate responses in celiac disease. *Mol Immunol*; 42:913-918 (2005).

Mackey J, Treem WR, Worley G, Boney A, Hart P, Kishnani PS. Frequency of celiac disease in individuals with Down syndrome in the United States. *Clin Pediatr.*; 40:249-252 (2001).

Maiuri L, Ciacci C, Auricchio S, Brown V, Quaratino S, Londei M. Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology*; 119:996-1006 (2000).

Maiuri L, Ciacci C, Vacca L, Ricciardelli I, Auricchio S, Quaratino S, Londei M. IL-15 drives the specific migration of CD94 and TCR- $\gamma\delta$ + intraepithelial lymphocytes in organ cultures of treated celiac patients. *Am J Gastroenterol*; 96:150-156 (2001).

Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S, Picard J, Osman M, Quaratino S, Londei M. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet*; 362:30-37 (2003).

Maki M & Collin P. Coeliac disease. *Lancet*; 349:1755-9 (1997).

Man AL, Prieto-Garcia ME, Nicoletti C. Improving M cell mediated transport across mucosal barriers: do certain bacteria hold the keys? *Immunology*; 113:15-22 (2004).

Mantovani V, Corazza GR, Bragliani M, Frisoni M, Zaniboni MG, Gasbarrini G. Asp 57-negative HLA-DQ beta chain and DQA1*0501 allele are essential for the onset of DQw2-positive and DQw2-negative coeliac disease. *Clin Exp Immunol*; 91: 53-6 (1993).

Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiological approach to the spectrum of gluten sensitivity ("coeliac sprue"). *Gastroenterology*; 102:330-354 (1992).

Matveeva E, Gryczynski Z, Malicka J, Gryczynski I, Lakowicz JR. Metal-enhanced fluorescence immunoassays using total internal reflection and silver island-coated surfaces. *Anal Biochem.*; 334(2):303-11 (2004).

Matysiak-Budnik T, Candalh C, Dugave C, Namane A, Cellier C, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Alterations of the intestinal transport and processing of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology*; 125:696-707 (2003).

Matysiak-Budnik T, Moura IC, Arcos-Fajardo M, Lebreton C, Menard S, Candalh C, Ben-Khalifa K, Dugave C, Tamouza H, van Niel G, Bouhnik Y, Lamarque D, Chaussade S, Malamut G, Cellier C, Cerf-Bensussan N, Monteiro RC, Heyman M. Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *J Exp Med*; 205:143-154 (2008).

Mearin ML, Biemond I, Peña AS, Polanco I, Vazquez C, Schreuder GT, de Vries RR, van Rood JJ. HLA-DR phenotypes in Spanish celiac children. Their contribution to the understanding of the genetics of the disease. *Gut*; 24:532-7 (1983).

Mention JJ, Ben Ahmed M, Begue B, Barbe U, Verkarre V, Asnafi V, Colombel JF, Cugnenc PH, Ruemmele FM, McIntyre E, Brousse N, Cellier C, Cerf-Bensussan N. Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology*; 125:730-745 (2003).

Meresse B, Chen Z, Ciszewski C, Tretiakova M, Bhagat G, Krausz TN, Raulet DH, Lanier LL, Groh V, Spies T, Ebert EC, Green PH, Jabri B. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity*; 21:357-366 (2004).

Meresse B, Curran SA, Ciszewski C, Orbelyan G, Setty M, Bhagat G, Lee L, Tretiakova M, Semrad C, Kistner E, Winchester RJ, Braud V, Lanier LL, Geraghty DE, Green PH, Guandalini S, Jabri B. Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease. *J Exp Med*; 203:1343-1355 (2006).

Meresse B, Verdier J, Cerf-Bensussan N. The cytokine interleukin 21: a new player in coeliac disease? *Gut*; 57:879-881 (2008).

Meresse B, Cerf-Bensussan N. Innate T cell responses in human gut. *Semin Immunol*; 21:121-129 (2009).

Meresse B, Ripoché J, Heyman M and Cerf-Bensussan N. Celiac disease: from oral tolerance to intestinal inflammation, autoimmunity and lymphomagenesis. *Nature*; Vol 2, N°1 (2009).

Michaelsson E, Malmstrom V, Reis S, Engstrom A, Burkhardt H, Holmdahl R. T cell recognition of carbohydrates on type II collagen. *J Exp Med*; 180:745-749 (1994).

Mohindra S, Yachha SK, Srivastava A, Krishnani N, Aggarwal R, Ghoshal UC Prasad KK, Naik SR. Coeliac disease in Indian children: assessment of clinical, nutritional and pathologic characteristics. *J Health Popul Nutr*; 19(3):204-8. (2001).

Molberg O, McAdam SN, Korner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen, L, Fugger L, Scott H, Noren O, Roepstorff P, Lundin KEA, Sjostrom H, Sollid LM. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognised by gut-derived T-cells in celiac disease. *Nat Med*; 4:713-717 (1998).

Myllotte M, Egan-Mitchell B, Fottrell PF, McNicholl B, McCarthy CF. Family studies in celiac disease. *Quarterly Medical Journal*; 171: 359-69 (1974).

Mylorte M, Egan-Mitchell B, McCarthy CF, McNicholl B. Incidence of celiac disease in the West of Ireland. *BMJ*; I: 703-5 (1973).

Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, Cheroutre H. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*; 317:256-260 (2007).

Mucida D, Park Y, Cheroutre H. From the diet to the nucleus: vitamin A and TGF-beta join efforts at the mucosal interface of the intestine. *Semin Immunol*; 21:14-21 (2009).

Murray JA, Van Dyke C, Plevak MF, Dierkhising RA, Zinsmeister AR, Melton AJ 3rd. Trends in the incidence and clinical features of celiac disease in a North American community, 1950-2001. *Clin Gastroenterol Hepatol.*; 1:19-27 (2003).

Nancey S, Holvoet S, Graber I, Joubert G, Philippe D, Martin S, Nicolas JF, Desreumaux P, Flourié B, Kaiserlian D. CD8+ cytotoxic T cells induce relapsing colitis in normal mice. *Gastroenterology*; 131:485-496 (2006).

National Institutes of Health. Statement. NIH Consensus Development Conference on Celiac Disease, June 28-30, 2004. *Gastroenterology*; 128 (suppl 1):S1-S9 (2005).

Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, Vyas JM, Boes M, Ploegh HL, Fox JG, Littman DR, Reinecker HC. CX3CR1-mediated dendritic

cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*; 307:254-258 (2005).

Nilsen E, Lundin K, Krajci P, Sollid L & Brantzaeg P. Gluten specific, HLA-DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with TH1 or TH0 profile dominated by interferon γ . *Gut* ; 37,766-776 (1995).

Niven MJ, Caffrey C, Moore RH, Sachs JA, Mohan V, Festenstein H, Hoover ML, Hitman GA. T-cell receptor beta-subunit gene polymorphism and autoimmune disease. *Hum Immunol*; 4:360-7 (1990).

Norris JM, Barriga K, Hoffenberg EJ, Taki, Miao D, Haas JE, Emery LM, Sokol RJ, Erlich HA, Eisenbarth GS, Rewers M. Risk of celiac disease autoimmunity and timing of gluten introduction in the diet of infants at increased risk of disease. *JAMA.*; 293:2343-2351 (2005).

O'Leary C, Walsh CH, Wieneke P, O'Regan P, Buckley B, O'Halloran DJ, Ferriss JB, Quigley EMM, Annis P, Shanahan FL, Cronin CC. Celiac disease and autoimmune Addison's disease: A clinical pitfall. *Q J Med.*; 95:79-82 (2002).

Oxentenko AS, Murray JA. Celiac disease and dermatitis herpetiformis: The spectrum of gluten-sensitive enteropathy. *Int J Dermatol.*; 42:585-587 (2003).

Palmer E. The generation of T cell tolerance. *Swiss Med Wkly*; 137(Suppl 155):99S-100S (2007).

Palova-Jelinkova L, Rozkova D, Pecharova B, Bártová J, Sedivá A, Tlaskalová-Hogenová H, Spísek R, Tucková L. Gliadin fragments induce phenotypic and functional maturation of human dendritic cells. *J Immunol*; 175:7038-7045 (2005).

Pardin C, Pelletier JN, Lubell WD & Keillor JW. Cinnamoyl inhibitors of tissue transglutaminase. *J. Org. Chem.*; 73,5766-5775 (2008).

Paterson BM, Lammers KM, Arrieta MC, Fasano A & Meddings JB. The safety, tolerance, pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of single doses of AT-1001 in coeliac disease subjects: a proof of concept study. *Aliment. Pharmacol. Ther.*; 26,757-766 (2007).

Pender SL, Tickle SP, Docherty AJ, Howie D, Wathen NC, MacDonald TT. A major role for matrix metalloproteinases in T cell injury in the gut. *J Immunol*; 158:1582-1590 (1997).

Piacentini M, Farrace MG, Piredda L, Matarrese P, Ciccocanti F, Falasca L, Rodolfo C, Giammarioli AM, Verderio E, Griffin M, Malorni W. Transglutaminase overexpression sensitizes neuronal cell lines to apoptosis by increasing mitochondrial membrane potential and cellular oxidative stress. *Journal of Neurochemistry*; 81(5):1061-72 (2002).

Picarelli A, Maiuri L, Frate A, Greco M, Auricchio S, Londei M. Production Of Antiendomysial Antibodies After In Vitro Gliadin Challenge Of Small Intestine Biopsy Samples From Patients With Coeliac Disease. *Lancet*; 348 (9034): 1065-7 (1996).

Picarelli A, Di Tola M, Sabbatella L, Anania MC, Di Cello T, Greco R, Silano M, De Vincenzi M. 31-43 Amino Acid Sequence Of The Alpha-Gliadin Induces Anti-Endomysial Antibody Production During In Vitro Challenge *Scand J Gastroenterol*; 34(11):1099-1102 (1999).

Pinier M, Verdu EF, Nasser-Eddine M, David CS, Vézina A, Rivard N, Leroux JC. Polymeric binders suppress gliadin-induced toxicity in the intestinal epithelium. *Gastroenterology* doi:10.1053/j. gastro.09.016.2008.

Pinkas DM, Strop P, Brunger AT, Khosla C. Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation. *PLoS Biol*; 5:e327 (2007).

Price P, Witt C, Allcock R, Sayer D, Garlepp M, Kok CC, French M, Mallal S, Christiansen F. The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases. *Immunological Reviews*; 167:257-74 (1999).

Przemioslo RT, Lundin KE, Sollid LM, Nelufer J, Ciclitira PJ. Histological changes in small bowel mucosa induced by gliadin sensitive T lymphocytes can be blocked by anti-interferon gamma antibody. *Gut*; 36:874-879 (1995).

Qiao SW, Bergseng E, Molberg Ø, Xia J, Fleckenstein B, Khosla C, Sollid LM. Antigen presentation to celiac lesion-derived T cells of a 33-mer gliadin peptide naturally formed by gastrointestinal digestion. *J. Immunol.*; 173, 1757-1762 (2004).

Qiao SW, Bergseng E, Molberg O, Jung G, Fleckenstein B, Sollid LM. Refining the rules of gliadin T cell epitope binding to the disease-associated DQ2 molecule in celiac disease: importance of proline spacing and glutamine deamidation. *J Immunol*; 175:254-261 (2005).

Raetsch IM, Catassi C. Coeliac disease is a primary, potentially treatable, health problem of Saharawi refugee children. *Bull World Health Organ.*; 79:541-5 (2001).

Raki M, Tollefsen S, Molberg O, Lundin KE, Sollid LM, Jahnsen FL. A unique dendritic cell subset accumulates in the celiac lesion and efficiently activates gluten-reactive T cells. *Gastroenterology*; 131(2):428-38 (2006).

Raki M, Schjetne KW, Stammaes J, Molberg O, Jahnsen FL, Issekutz TB, Bogen B, Sollid LM. Surface expression of transglutaminase 2 by dendritic cells and its potential role for uptake and presentation of gluten peptides to T cells. *Scand J Immunol*; 65:213-220 (2007).

Rensch MJ, Szykowski R, Shaffer RT. The prevalence of celiac disease autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Gastroenterol.*; 96:1113-1115 (2001).

Reunala T. Dermatitis herpetiformis: Coeliac disease of the skin. *Ann Med.*;5:416-418 (1998).

Roschmann E, Wienker TF, Gerok W, Volk BA. T-cell receptor variable genes and genetic susceptibility to celiac disease: an association and linkage study. *Gastroenterology*; 105: 1790-6 (1993).

Roy R, Hohng S, Ha T. A practical guide to single-molecule FRET. *Nat Methods.*; 5(6):507-16 (2008).

Sakula J & Shiner M. Coeliac disease with atrophy of the small intestine mucosa. *Lancet*; 273, 876-877 (1957).

Salvati VM, Mazzarella G, Gianfrani C, Levings MK, Stefanile R, De Giulio B, Iaquinto G, Giardullo N, Auricchio S, Roncarolo MG, Troncone R. Recombinant human interleukin 10 suppresses gliadin dependent T cell activation in ex vivo cultured coeliac intestinal mucosa. *Gut*; 54: 46-53 (2005).

Sategna Guidetti C, Solerio E, Scaglione N, Aimo G, Mengozzi G. Duration of gluten exposure in adult coeliac disease does not correlate with the risk for autoimmune disorders. *Gut*; 49:502-505 (2001).

Schulzke JD, Bentzel CJ, Schulzke I, Riecken EO, Fromm M. Epithelial tight junction structure in the jejunum of children with acute and treated celiac sprue. *Pediatr Res*; 43:435-441 (1998).

Schumann M, Richter JF, Wedell I, Moos V, Zimmermann-Kordmann M, Schneider T, Daum S, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Mechanisms of epithelial translocation of the α 2-gliadin-33mer in coeliac sprue. *Gut*; 57:747-754 (2008).

Scott H, Sollid LM, Fausa O, Brandtzaeg P, Thorsby E. Expression of major histocompatibility complex class-II subregion products by jejunal epithelium in patients with celiac disease. *Scand J Immunol*; 26:563-571(1987).

Shahbazkhani B, Maghari M, Nasser Moghaddam S, Kamalian N, Sotoudeh M, Minapour M, et al. Prevalence of celiac disease among Iranian patients with chronic diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 31(suppl. 3):S4 (2000).

Shan L, Molberg O, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM, Khosla C. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*; 297:2275-2279 (2002).

Sheldon W. Prognosis in early adult life of celiac children treated with a gluten-free diet. *BMJ*; 2:401-404 (1969).

Shtoyko T, Matveeva EG, Chang IF, Gryczynski Z, Goldys E, Gryczynski I. Enhanced fluorescent immunoassays on silver fractal-like structures. *Anal Chem.*; 80(6):1962-6. Epub 2008 Feb 21 (2008).

Shuo-Wang Qiao, Ludvig M Sollid and Richard S Blumberg. Antigen presentation in celiac disease. *Current Opinion in Immunology*; 21:111-117 (2009).

Siegel M, Strnad P, Watts RE, Choi K, Jabri B, Omary MB, Khosla C. Extracellular transglutaminase 2 is catalytically inactive, but is transiently activated upon tissue injury. *PLoS ONE*; 3:e1861 (2008).

Sjöberg K, Eriksson KF, Brendberg A, Wassmuth R, Eriksson S. Screening for celiac disease in adult insulin-dependent diabetes mellitus. *J Intern Med*; 243, 133-140 (1998).

Sjostrom H, Lundin KEA, Molberg O, Korner R, McAdam SN, Anthonsen D, Quarsten H, Noren O, Roepstorff P, Thorsby E, Sollid LM. Identification of a gliadin T-cell epitope in celiac disease: general importance of gliadin deamidation for intestinal T-cell recognition. *Scand J Immunol*; 48:111-115 (1998).

Skipper JC, Hendrickson RC, Gulden PH, Brichard V, Van PA, Chen Y, Shabanowitz J, Wolfel T, Slingsluff CL Jr, Boon T, Hunt DF, Engelhard VH. An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from

posttranslational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. *J Exp Med*; 183:527-534 (1996).

Smith TR, Kumar V. Revival of CD8⁺ Treg-mediated suppression. *Trends Immunol*; 29:337-342 (2008).

Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ α/β heterodimer. *J Exp Med*; 169: 345-350 (1989).

Sollid LM, Molberg O, McAdam S & Lundin K E. Autoantibodies in coeliac disease: tissue transglutaminase—guilt by association? *Gut*; 41,851-852 (1997).

Sollid LM. Molecular basis of celiac disease. *Annu. Rev. Immunol.*; 18,53-81 (2000).

Sollid LM & Khosla C. Future therapeutic options for celiac disease. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.*; 2,140-147 (2005).

Sollid LM, Lie BA. Celiac disease genetics: current concepts and practical applications. *Clin Gastroenterol Hepatol*; 3:843-51 (2005).

Sollid LM and Lundin KEA. Diagnosis and treatment of celiac disease. *Mucosal Immunology*. Vol. 2, N° 1 (2009).

Sorell L, Garrote JA, Acevedo B, Arranz E. One-step immunochromatographic assay for screening of celiac disease. *Lancet*; 359:945-946 (2002).

Stene LC, Honeyman MC, Hoffenberg EJ, Haas JE, Sokol RJ, Emery L, Taki I, Norris JM, Erlich HA, Eisenbarth GS, Rewers M. Rotavirus Infection Frequency and Risk of Celiac Disease Autoimmunity in Early Childhood: A Longitudinal Study. *The American Journal of Gastroenterology*; 101, 2333-2340 (2006).

Stepniak D, Spaenij-Dekking L, Mitea C, Moester M, de Ru A, Baak-Pablo R, van Veelen P, Edens L, Koning F. Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol*. 291, G621-G629 (2006).

Stepniak D, Wiesner M, de Ru AH, Moustakas AK, Drijfhout JW, Papadopoulos GK, van Veelen PA, Koning F. Large-scale characterization of natural ligands explains the unique gluten-binding properties of HLA-DQ2. *J Immunol*; 180: 3268-3278 (2008).

Stern M, Ciclitira PJ, van Eckert R, Feighery C, Janssen FW, Méndez E, Mothes T, Troncone R, Wieser H. Analysis and clinical effects of gluten in coeliac disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*; 13:741-747 (2001).

Sturges RP, Day P, Ellis HJ, Lundin KEA, Gjertsen H, Kontakou M, Ciclitira PJ. Wheat peptide challenge in coeliac disease. *Lancet*; 343:758-761 (1994).

Sulkanen S, Halttunen T, Laurila K, Kolho K-L, Korponay-Szabo IR, Sarnesto A, Savilahto E, Collin P, Maki M. Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting coeliac disease. *Gastroenterology*; 115:1322-1328 (1998).

Talal AH, Murray JA, Goeken JA, Sivitz WI. Celiac disease in an adult population with insulin-dependent diabetes mellitus: Use of endomysial antibody testing. *Am J Gastroenterol.*; 92:1280-1284 (1997).

Terrazzano G, Sica M, Gianfrani C, Mazzarella G, Maurano F, De Giulio B, de Saint-Mezard S, Zanzi D, Maiuri L, Londei M, Jabri B, Troncone R, Auricchio S, Zappacosta S, Carbone E. Gliadin regulates the NK-dendritic cell cross-talk by HLA-E surface stabilization. *J Immunol*; 179:372-381 (2007).

Thomas KE, Sapone A, Fasano A, Vogel SN. Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in Celiac disease. *J Immunol*; 176:2512-2521 (2006).

Tollefsen S, rentz-Hansen H, Fleckenstein B, Molberg O, Raki M, Kwok WW, Jung G, Lundin KEA, Sollid LM. HLA-DQ2 and -DQ8 signatures of gluten T cell epitopes in celiac disease. *J Clin Invest*; 116:2226-2236 (2006).

Tosi R, Vismara D, Tanigaki N. Evidence that celiac disease is primarily associated with a DC locus allelic specificity. *Clinical Immunology and Immunopathology*; 28:395-404 (1983).

Troncone R, Maurano F, Rossi M, Micillo M, Greco L, Auricchio R, Salerno G, Salvatore F, Sacchetti L. IgA antibodies to tissue transglutaminase: an effective diagnostic test for celiac disease. *J. Pediatr.*; 134:166-171 (1999).

Tuckova L, Novotna J, Novak P, Flegelová Z, Kveton T, Jelínková L, Zídek Z, Man P, Tlaskalová-Hogenová H. Activation of macrophages by gliadin fragments: isolation and characterization of active peptide. *J Leukoc Biol*; 71:625-631 (2002).

Vader LW, de Ru A, van der WY, Kooy YM, Benckhuijsen W, Mearin ML, Drijfhout JW, van Veelen P, Koning F. Specificity of tissue transglutaminase explains cereal toxicity in celiac disease. *J Exp Med*; 195:643-649 (2002).

Vader W, Kooy Y, van Veelen P, de Ru A, Harris D, Benckhuijsen W, Pena S, Mearin L, Drijfhout JW, Koning F. The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides. *Gastroenterology*; 122:1729-1737 (2002).

Vader LW, Stepniak DT, Bunnik EM, Kooy YM, de Haan W, Drijfhout JW, Van Veelen PA, Koning F. Characterization of cereal toxicity for celiac disease patients based on protein homology in grains. *Gastroenterology*; 125, 1105-1113 (2003).

Vader W, Stepniak D, Kooy Y, Mearin L, Thompson A, van Rood JJ, Spaenij L, Koning F. The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten-specific T cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 100,12390-12395 (2003).

Van de Kamer J, Weijers H & Dicke WK. Coeliac disease. Some experiments on the cause of the harmful effect of wheat gliadin. *Acta Paediatr. Scand.*; 42,223-231 (1953).

Van de Wal Y, Kooy Y, van Veelen P, Peña S, Mearin L, Papadopoulos G, Koning F. Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *Journal of Immunology*; 161(4):1585-8 (1998).

Van de Wal Y, Kooy YM, van Veelen PA, Pena SA, Mearin LM, Molberg O, Lundin KEA, Sollid LM, Mutis T, Benckhuijsen WE, Drijfhout JW, Koning F. Small intestinal T cells of celiac disease patients recognize a natural pepsin fragment of gliadin. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 95:10050-10054 (1998).

Van de Wal Y, Kooy YMC, van Veelen P, Vader W, August SA, Drijfhout JW, Pena SA, Koning F. Glutenin is involved in the gluten-driven mucosal T cell response. *Eur J Immunol*; 29:3133-3139 (1999).

Van Heel DA, Hunt K, Greco L, Wijmenga C. Genetics in coeliac disease. *Best Practice & Research*; 19(3):323-39 (2005).

Van Heel DA, Franke L, Hunt KA, Gwilliam R, Zhernakova A, Inouye M, Wapenaar MC, Barnardo MC, Bethel G, Holmes GK, Feighery C, Jewell D, Kelleher D, Kumar P, Travis S, Walters JR, Sanders DS, Howdle P, Swift J, Playford RJ, McLaren WM, Mearin ML, Mulder CJ, McManus R, McGinnis R,

Cardon LR, Deloukas P, Wijmenga C. A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nat. Genet.*; 39:827-829 (2007).

Van Wijk F, Cheroutre H. Intestinal T cells: facing the mucosal immune dilemma with synergy and diversity. *Semin Immunol*; 21:130-138 (2009).

Ventura A, Magazzu G, Greco L. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease. *Gastroenterology*; 117:297-303 (1999).

Viljamaa M, Kaukinen K, Huhtala H, Kyronpalo S, Rasmussen M, Collin P. Coeliac disease, autoimmune diseases and gluten exposure. *Scand J Gastroenterol*; 40:437-443 (2005).

Volta U, Rodrigo L, Granito A, Petrolini N, Muratori P, Muratori L, Linares A, Veronesi L, Fuentes D, Zauli D, Bianchi FB. Celiac disease in autoimmune cholestatic liver disorders. *Am J Gastroenterol.*; 97:2609-2613 (2002).

Walker-Smith JA. Discordance for childhood celiac disease in monozygotic twins. *Gut*; 14: 374-5 (1973).

Wang W, Uzzau S, Goldblum SE, Fasano A. Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *Journal of Cell Science*; 113(Pt 24):4435-40 (2000).

Westendorf AM, Fleissner D, Deppenmeier S, Gruber AD, Bruder D, Hansen W, Liblau R, Buer J. Autoimmune-mediated intestinal inflammation-impact and regulation of antigen-specific CD8+T cells. *Gastroenterology*; 131:510-524 (2006).

Whelan A, Willoughby R, Weir D. Human umbilical vein endothelial cells: a new easily available source of endomysial antigens. *Eur J Gastroenterol Hepatol.*; 8(10):961-6 (1996).

Wieser H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol.*; 24,115-119 (2007).

Xia J, Bergseng E, Fleckenstein B, Siegel M, Kim CY, Khosla C, Sollid LM. Cyclic and dimeric gluten peptide analogues inhibiting DQ2-mediated antigen presentation in celiac disease. *Bioorg. Med. Chem.*; 15,6565-6573 (2007).

Yiannakou JY, Dell'Olio D, Saaka M, Ellis HJ, Rosen-Bronson S, Dumonde DC, Ciclitira PJ. Detection and characterisation of antiendomysial antibody in coeliac

disease using human umbilical cord. *Int Arch Allergy Immunol*; 112:140-144 (1997).

Yiannakou JY, Brett PM, Morris MA, Curtis D, Mathew C, Vaughan R, Rosen-Bronson S, Ciclitira PJ. Family linkage study of the T-cell receptor genes in coeliac disease. *Ital J Gastroenterol Hepatol*; 31:198-201 (1999).

Yoshida M, Claypool SM, Wagner JS, Mizoguchi E, Mizoguchi A, Roopenian DC, Lencer WI, Blumberg RS. Human neonatal Fc receptor mediates transport of IgG into luminal secretions for delivery of antigens to mucosal dendritic cells. *Immunity*; 20:769-783 (2004).

Zanoni G, Navone R, Lunardi C, Tridente G, Bason C, Sivori S, Beri R, Dolcino M, Valletta E, Corrocher R, Puccetti A. In celiac disease, a subset of autoantibodies against transglutaminase binds toll-like receptor 4 and induces activation of monocytes. *PLoS Med.*; Sep;3(9):e358 (2006).